

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIATEADUSKOND
ZOOLOOGIA JA HÜDROBIOLOOGIA INSTITUUT

MERLIN PLOOM

**shRNA-l põhineva geenivaigistusmeetodi rakendamine neeru
morfogeneesi uurimisel**

Magistritöö
Arengubioloogia

Juhendajad: Madis Jakobson, MSc
Illar Pata, PhD
Raivo Raid, biol.-kandidaat

Tartu 2005

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
1. SISSEJUHATUS	6
2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
2.1 Neeru areng	8
2.2 Neeru organogeneesis osalevad kasvufaktorid	12
2.2.1 GDNF, GFR α 1 ja Ret: signaalikompleks, mis reguleerib kusejuha punga väljakasvu	12
2.2.2 Wnt perekonna signaalmolekulid	13
2.2.2.1 Wnt-11	13
2.2.2.2 Wnt-4	14
2.2.3 Bmp7	14
2.3 Transkriptsioonifaktorid	14
2.3.1 WT1	14
2.3.2 Gata3	15
2.3.3 Pax2	17
2.3.4 Pax8	18
2.4 Apoptoos neeru arengus	19
2.5 RNA interferents	20
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	24
2.1 TÖÖ EESMÄRGID	24
2.2 MATERJAL JA METOODIKA	25
2.2.1 Kloneerimine	25
2.2.1.1 shRNA ekspressioonivektori konstrueerimine	25
2.2.2 Koekultuur	26
2.2.2.1 Rakuliinid	26
2.2.2.2 Transfektsioon	26
2.2.3 Pöördtranskriptsioon-polümeraas-ahelreaktsioon (RT-PCR)	27
2.2.3.1 RNA eraldamine HeLa rakkudest	27
2.2.3.2 Pöördtranskriptsioon	27
2.2.3.3 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)	28
2.2.4 Immuunoblot	28
2.2.6 Sabaveeni süstimine	29
2.2.7 β -galaktosidaasi töötlus	30
2.2.8 mRNA <i>in situ</i> hübridisatsioon	30
2.2.9 Urogenitaalsüsteemi dissekteerimine	30
3. TULEMUSED	31
3.1 DNA vektoril põhineva Gata3 ja Pax8 shRNA-de disainimine	31
3.2 Gata3RNAi ja Pax8RNAi inhibeerivad oma märklaudgeenide mRNA taset HeLa rakkudes	32
3.3 Valgu hulk on spetsiifiliselt vähenenud RNAi-st mõjutatud rakkudes	33
3.4 Gata3 reguleerib kusejuha harunemist	34
3.5 Hilised Gata3 mutantsed ellujääjad	36
3.6 Pax8 spetsiifiline shRNA vaigistab efektiivselt Pax8 ekspressiooni	37
4. ARUTELU	39

5. KOKKUVÕTE	45
6. SUMMARY.....	46
TÄNUAVALDUSED.....	47
KASUTATUD KIRJANDUS	48

KASUTATUD LÜHENDID

AP – aluseline fosfataas

BCIP – 5-bromo-4-klooro-3-indolüülfosfaat p-toluidiin

bp – aluspaar

cDNA – komplementaarne DNA

CHO – hiina hamstri munasarjakasvaja rakud

DIG – digoksügeniin

DTT – ditiotreitool

E12 – 12. arengupäev

forward - päripidine

GAPDH – glütseeraldehüüd-3-fosfaadi dehüdrogenaas

GDNF – gliiapärane närvikasvufaktor

GFR α 1 – GDNF-i perekonna abireseptor α 1

GPI – glükosüülfosfatidüülinositol

HeLa – emakakaela vähkkasvaja rakud

IgG – immunoglobuliin G

IMDM – *Iscove's modified Dulbecco's medium*

in situ – kohapeal

in vitro – katseklaasis

in vivo – elusas organismis

kb – kiloaluspaar

knockdown – geeniekspressiooni allareguleerimine

knockout – uuritava geeni järjestuse asendamine mittefunktsionaalsega

lacZ – *E.coli* β -galaktosidaasi kodeeriv geen

NBT – nitrosinine tetrasooliumkloriid

PBS – fosfaatpuhvri soolalahus (Phosphate Buffered Saline)

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon

Ret – transmembraanne türosiin-kinaasne retseptor

reverse - äraspidine

RISC – RNA poolt indutseeritud vaigistuskompleks (RNA-induced silencing complex)

RNAi – RNA interferents

RT-PCR – pöördtranskriptsioon-PCR

SDS – naatriumdodetsüülsulfaat (sodium dodecylsulphate)

shRNA – väike juuksenõelastruktuuriga RNA (small hairpin RNA)

siRNA – väike interfereeruv RNA (small interfering RNA)

SSC – naatriumkloriidi ja naatriumsitraadi lahus

TAE – Tris/atsetaat/EDTA puhver

TE – Tris-EDTA puhver

Tris – trishüdrosümetüülaminometaan

β-gal – β-galaktosidaas

1. SISSEJUHATUS

Selgroogsete organite areng toimub läbi keeruliste kudede- ja rakkudevaheliste interaktsioonide, mis tagavad kooskõla rakkude kasvamise, diferentseerumise ja kudede morfogeneesi vahel. Imetajate, peamiselt hiire ja roti, neeru on juba üle 50 aasta kasutatud kui mudelsüsteemi, et tundma õppida nii embrüogeneesi mehhanisme kui ka selgroogsete organite moodustumise molekulaarset regulatsiooni. Metanefrose areng saab hiirel alguse 10,5 arengupäeval, mil metanefriiline mesenhüüm indutseerib kusejuha punga väljakasvu Wolffii juhast. Üheks keskseks molekuliks, mis varast neeru arengut reguleerib, on transkriptsioonifaktor Gata3. Urogenitaalsüsteemis ekspresseeritakse Gata3 mesonefrilistes tuubulites ning Wolffii juhas ja sellest pärinevates struktuurides. Lisaks neerule on Gata3 oluline paljude muude organite morfogeneesis ning tema puudumine põhjustab homosügootsete mutantide surma umbes 11. arengupäeval. Seetõttu ei tunta Gata3 funktsiooni hilisemas neeru arengus. Varasemast on teada, et ka Pax perekonna transkriptsioonifaktorid Pax2 ja Pax8 osalevad pronefroose formeerumisel, Wolffii juha diferentseerumises ja hiljem neeru arengus. Samuti on häiritud Pax2/8 mutantse Wolffii juha areng. Kõik see viitab võimalusele, et nimetatud kolm transkriptsioonifaktorit paiknevad ühises regulatsioonirajas, mis kontrollib Wolffii juha diferentseerumist ja pikenemist.

Geenide väljalülitamine homoloogse rekombinatsiooni teel hiire embrüonaalsetes tüvirakkudes on andnud tähelepanuväärseid tulemusi imetajate geenide funktsioonide tundma õppimisel. Nimetatud meetodi puuduseks on, et sellega ei saa uurida varajast letaalsust põhjustavate geenide võimalikke funktsioone hilises arengus. Sellest kitsaskohast ülesaamiseks on võimalik kasutada nii konditsionaalseid mutante kui ka RNA interferentsi meetodit. RNAi fenomen avastati esimesena varbussis *C. elegans* 1998-ndal aastal, kuid tänaseks tuntakse teda juba ka paljudes teistes organismides alates taimedest kuni imetajateni. RNAi tagajärjel toimub märklaudgeeni post-transkriptsiooniline vaigistamine. See meetod on kõrge spetsiifikaga ja võimaldab efektiivselt geenide aktiivsust vaigistada.

Käesoleva töö eksperimentaalses osas kasutasin ma RNAi meetodit, et uurida transkriptsioonifaktor Gata3 rolli neeru morfogeneesis. Lisaks eksperimenteerisin ka transkriptsioonifaktor Pax8 spetsiifilist shRNA-d kodeeriva plasmiidiga, mis annab meile võimaluse uurida transkriptsioonifaktorite Pax2 ja Pax8 rolli Gata3 reguleerimisel. Kuna tegemist on väga uudse meetodiga, kontrollisin ma esmalt RNAi efektiivsust rakukultuuris.

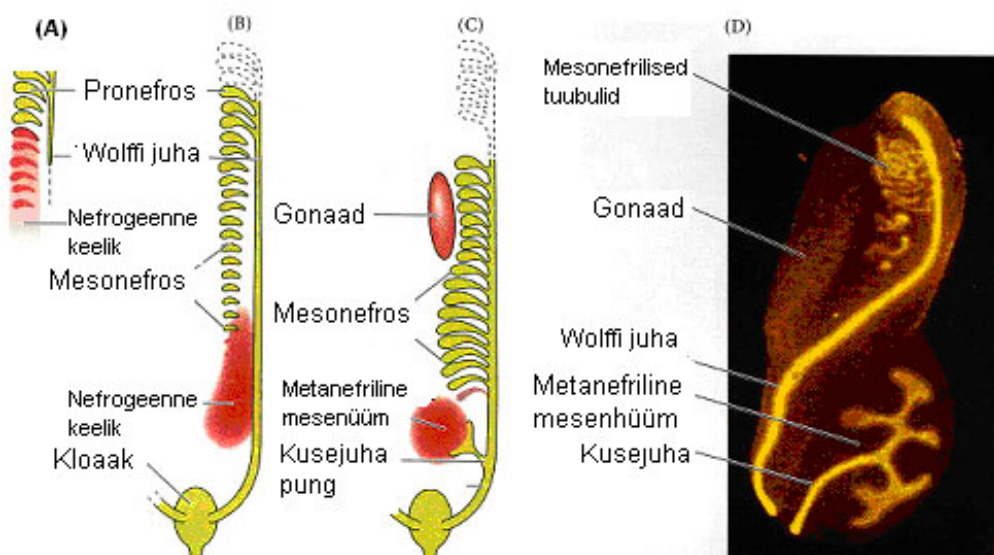
Selleks elektroporeerisin ma HeLa rakke Pax8 ja Gata3 shRNA-d kodeerivate plasmiididega. Pärast seda, kui RNAi meetod oli rakukultuuri tasemel töökindlalt paigas, süstisin ma geenispetsiifilist RNA interferentsi põhjustavaid plasmiide tiinetesse hiirtesse, eesmärgiga jälgida geenivaigistamise mõju embrüote urogenitaalsüsteemi arengule. Eriti märkimisväärsed tulemusi sain geeni vaigistamisel *in vivo*, süstides Pax8 spetsiifilist shRNA-d kodeerivat plasmiidi metsiktüüpi tiinetesse hiirtesse.

2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

2.1 Neeru areng

Neer on oluline mudelsüsteem, mis võimaldab imetajate organogeneesi paremini tundma õppida (Davies ja Bard, 1998; Kuure *et al.*, 2000). Neeru areng on äärmiselt komplitseeritud protsess, milles rakendatakse palju erinevaid morfogeneesi mehhanisme nagu pungumine, kudede vahelised induktiivsed interaktsioonid, tüvirakkude kasv ja diferentseerumine, mesenhüümi konversioon epiteeliks, kusejuha harunemine, apoptoos, nefronite liitumine kogumistorukestega ning nende proksimodistaalne segmentatsioon. Tänapäevaks on teada, et neeru arengus osaleb üle 300 geeni (Valerius, 2002).

Imetajate neer läbib arengus kolm staadiumit, mis erinevad üksteisest nii lootes paiknemise kui morfoloogilise keerukuse poolest (vt. joonis 1). Kaks esimest on ajutised ja suhteliselt lihtsa struktuuriga. See-eest kolmas ning kõige viimane on kõrgelt diferentseerunud ja talitleb kogu sünnijärgse elu jooksul (Saxen, 1987). Vaatamata suurtele ehituslikele ja funktsionaalsetele erinevustele, on kõik kolm neerutüüpi omavahel siiski arenguliselt seotud. Iga järgnev neerustaadium saab areneda üksnes siis, kui eelnev on häireteta välja kujunenud.



Joonis 1. Üldine skeem selgroogsete neeru arengust. Pildidel 1A-C on näidatud erinevate neeruvormide järkjärguline arenguskeem. Pildil 1D on kujutatud 13 lootepäeva vanuse hiire vahelist mesodermi, kus võib näha arenevat metanefrost ning säilinud Wolffii juha. Epiteeliaalsed struktuurid on märgistatud fluorestseeruva tsütokeratiinivastase antikehaga. (Gilbert, 1997)

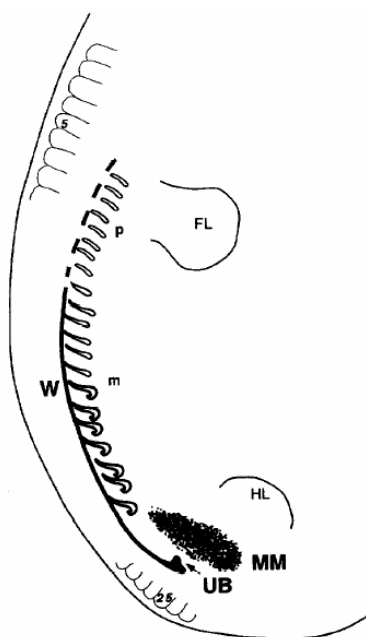
Esimene ja kõige lihtsama struktuuriga neerutüüp kõikidel selgroogsetel on pronefros ehk eelneer. Võrreldes järgmiste neerustaadiumitega paikneb ta kõige anterioorsemalt. Kaladel ja amfiibidel funktsioneerib ta ekskretoorse organina, kuid imetajatel on ta üksnes rudimentaarne ajutine struktuur, mis sõltuvalt liigist võib täita eritusülesandeid varases embrüonaalses arengus (Torres *et al.*, 1995). Seega on tema tähtsus erituselundina liigispetsiifiline ja sõltub eelkõige organismi fülogeneetilisest iseärasustest. Nii on ta funktsionaalne inimese, küüliku ja sea embrüogeneesis, kuid tema roll erituselundina hiire puhul on kaheldav. Samuti erineb liigiti pronefroose struktuur ja nefronite arv (Vize *et al.*, 1997). Pronefros moodustub vahlemisest mesodermist, mis asub somiitide ja külgmise mesodermi vahel ja on hiirel morfoloogiliselt eristatav alates 7,5. arengupäevast (Saxen, 1987). Pronefroose juha formeerumisel on oluline roll ka pinnaepiteelil ning selles ekspresseeruv Bmp4 kasvufaktoril (Obara-Ishihara *et al.*, 1999). Pronefrilised torukesed on ühendatud pronefrilise juhaga, mis arvatakse moodustuvat kaudaalsete pronefriliste torukeste liitumise tulemusena. Pärast formeerumist juha pikeneb esijäsemepungade piirkonnast kaudaalsuunas. Imetajatel pronefrilised tuubulid ja pronefrilise juha anterioorne osa degenereeruvad, kuid kaudaalne juha säilib ja on ekskretoorse süsteemi põhikomponendiks kogu järgneva arengu jooksul (Saxen, 1987). Seda alles jäävat juha nimetatakse nefriliseks ehk Wolff'i juhaks (Sainio ja Raatikainen- Ahokas, 1999).

Pärast Wolff'i juha moodustumist toimub tema kaudaalsuunaline pikenemine. Senised andmed näitavad, et see protsess on suuresti liigispetsiifiline. Pikenemine toimub kas *in situ* uute mesenhümaalsete rakkude värbamise teel vahlemisest mesodermist, mis on leidnud veenvat tõestust sebrakalal (Serluca ja Fishman, 2001), või hoopis juha kaudaalsete tipurakkude proliferatsiooni läbi. Lisaks esineb ka aktiivset nefrilise juha rakkude migratsiooni, mis on valdavaks mehhanismiks aksolotli ja kana embrüotes (Drawbridge ja Steinberg, 1996; Obara-Ishihara *et al.*, 1999). Kannuskonnal on nefrilise juha pikenemisel kasutusel mesenhümaalsete rakkude kaasamine, kuid suurt rolli mängib ka rakkude endi liikumine (Lynch ja Fraser, 1990; Cornish ja Etkin, 1993). Imetajate Wolff'i juha pikenemise protsessi täpselt ei tunta, kuid on andmeid, et inimese puhul kaasatakse osa rakke kõrval asuvast mesenhüümist (Bellairs *et al.*, 1995).

Samaaegselt pronefroose apoptootilise lagunemisega indutseerib kaudaalselt kasvav Wolff'i juha kõrval asuvas mesenhüümis mesonefroose moodustumise. Hiires toimub see protsess 9,5. arengupäeval. Kalades ja amfiibides on mesonefros lõplikuks neeruvormiks, mis talitleb kogu

nende elu jooksul (Vize *et al.*, 1997; Drummond *et al.*, 1998). Mesonefroose organogeneesi saab alguse siis, kui pronefriline juha jõuab mesonefrilisse mesenhüümi ja indutseerib kõrval paiknevaid mesenhümaalseid rakke kondenseeruma. Viimased panevad aluse mesonefrilistele tuubulitele, mis võrreldes pronefriliste torukestega arenevad keerukateks glomeeruliga varustatud nefroniteks (Saxen, 1987). Nefronite suurus ja jaotus erineb liigiti, näiteks sigadel ja inimestel on mesonefrilised nefronid funktsionaalsed, samas kui närilistel on mesonefros algeline ja mittesekretoorne (Smith ja McKay, 1991; Gilbert, 1997; Kuure *et al.*, 2000). Vaatamata mesonefroose lühiajalisusele on tal siiski tähtis funktsioon arengus. Ta on hematopoeetiliste tüvirakkude algallikaks, mis on olulised vererakkude arenemisel (Medvinsky ja Dzierzak, 1996; Wintour *et al.*, 1996). Isastes kaotavad mesonefrilised tuubulid pärast väljakujunemist oma ekskretoorse funktsiooni ja kujunevad ümber suguelundkonna komponentideks - seemnejuhadeks ja seemnevesiikuliteks. Wolff'i juhast areneb mundimanus. Emastes Wolff'i juha taandareneb peaaegu täielikult ning emassuguorganid saavad alguse hoopis Mülleri juhast, mis pärineb samuti vahelmisest mesodermist ja saadab Wolff'i juha. Arvatakse, et Wnt-4, mis ekspresseerub mesonefroses ja munasarjas, on oluline emastes isendites soo determineerimisel (Vainio *et al.*, 1999). Mülleri juha tekkides on seksuaalne dimorfism selge (Magre ja Jost, 1984; Gilbert, 1997; Jacob *et al.*, 1999). Neeru ja suguelundite morfogeneesi sõltub Wolff'i juha tekkimisest ja elongatsioonist embrüogeneesi jooksul (Saxen, 1987).

Amniootidel on püsivaks neeruks metanefros, mis kujuneb peale mesonefroose taandarenemist kaudaalsemas piirkonnas ja tekib allesjäänud Wolff'i juha kõrvale. Imetajate embrüos saab metanefros alguse kahe mesodermaalse derivaadi kusejuha punga ja metanefrilise mesenhüümi vastastikustest interaktsioonidest (Lechner ja Dressler, 1997; joonis 2). Ajaliselt toimub see hiire 10,5. arengupäeval ja inimeses viiendal rasedusnädalal. Esmalt toimub vastusena metanefrilise mesenhüümi signaalidele kusejuha punga väljakasvamine Wolff'i juhast. Metanefrilise mesenhüümi rakud, mis on selleks hetkeks selgelt eristunud morfoloogiliselt ümbritsevast mesenhüümist, paiknevad tihedalt mesonefrilise juha kõrval moodustades metanefrilise keeliku (Saxen, 1987).



Joonis 2. Areneva hiire embrüo nefrilise süsteemi skeem. p-pronefros, m-mesonefros, MM-metanefriline mesenhüüm, UB-kusejuha pung, FL-esijäsemepung, HL-tagajäsemepung (Lechner ja Dressler, 1997).

Rakud tihenevad induksiooni tulemusena ümber kasvava kusejuha punga ning jaotuvad seejärel kaheks, kuna pung hakkab harunema. (Lechner ja Dressler, 1997). Mesenhümaalset kudet vajatakse kusejuha punga jätkuvaks kasvamiseks ja harunemiseks (Saxen, 1987). Esialgse kusejuha punga moodustumises on oluline gliiapärane närvikasvufaktor (GDNF) (Sainio *et al.*, 1997; Vega *et al.*, 1996) koos oma retseptoritega GFR α 1 (Cacalano *et al.*, 1998) ja türosiinkinaasse Ret-ga (Schuchardt *et al.*, 1994; Schuchardt *et al.*, 1996). Koretseptoreid GFR α 1 ja Ret ekspresseeriv Wolffi juha liigub suurema GDNF kontsentratsiooni suunas (Drawbridge *et al.*, 2000). Mesenhüüm epitelizeerub pärast kusejuha punga tekkimist Wolffi juhast (Saxen, 1987; Schuchardt *et al.*, 1994; Vainio ja Muller, 1997; Barasch, 2001). Kusejuha pung omakorda signaliseerib pikenedes ja harunedes metanefrilist mesenhüümi kondenseeruma ja diferentseeruma nefronite, glomeerulite ja neerutorukeste epiteelirakkudeks. Moodustub neeru kogumistorukeste süsteem, neeruvaagen ning kusejuha, mis tühjendab neeru uriinist (Saxen, 1987). Nendest mesenhümaalsetest rakkudest, mis ei kondenseerunud ümber kusejuha tippude ja millest ei tekkinud epiteliaalseid struktuure, moodustub neeru strooma. Kondenseerunud mesenhüümi rakkudest moodustunud nefroni alges ekspresseeritakse intensiivselt transkriptsioonifaktoreid WT-1 (Kriedberg *et al.*, 1993), Pax2 (Rothenpieler ja Dressler, 1993) ning Wnt-4 signaalmolekule (Vainio ja Muller, 1997; Stark *et al.*, 1994).

Arenevas neerus toimub induktsioone korduvalt, seetõttu paiknevad vanemad nefronid keskel ja uuemad lisanduvad perifeeriasse. Hiirtel kestab see protsess veel 7-10 päeva pärast sündi. Nefrogeneesi tulemusena moodustub hiirel umbes 10000 nefronit. Arenev nefron, mis sisaldab üle 10 000 erineva raku, jaotub 3 osaks: glomeeruliks ja proksimaalseks ning distaalseks tuubuliks (Plachov *et al.*, 1990).

Hiire neeru kasv on muljetavaldav, mõõtmised on näidanud, et neer peaaegu kolmekordistub oma suuruses iga päev perioodil E12-16 ja järgnevalt kahekordistub, kuni sünnini (Davies ja Bard, 1998). Täiskasvanud neeru lõplik suurus on väga varieeruv, normaalses neerus on inimesel nefroneid 600 000- 1 miljon, hiirel 3000- 5000 (Merlet-Benichou *et al.*, 1997). Metanefros on ilmselgelt kõrgemate selgroogsete (amniootide) kõige keerukamaks erituseelundiks (Gilbert, 1997).

2.2 Neeru organogeneesis osalevad kasvufaktorid

Tänaseks on teada, et metanefrose arengu indutseerivad metanefrilisest mesenhüümist pärinevad signaalmolekulid, mis soodustavad kusejuha punga väljakasvu Wolff'i juhast ja samas signaliseerib kusejuha ka omakorda metanefrilise mesenhüümi diferentseeruma. Neis nefrogeneesis toimuvais vastastikustes induktsioonides osalevad mitmed rakkudevahelised signaalid, mis reguleerivad rakkude jagunemist, apoptoosi, diferentseerumist ja liikuvust (Lechner ja Dressler, 1997).

2.2.1 GDNF, GFR α 1 ja Ret: signaalikompleks, mis reguleerib kusejuha punga väljakasvu

GDNF eraldati ja iseloomustati 1993. aastal ning hiljem on näidatud, et ta täidab olulist funktsiooni spermatogeneesis, neeru arengus ning mitmetes närvisüsteemi arenguprotsessides (Lin *et al.*, 1993; Durbec *et al.*, 1996; Trupp *et al.*, 1996; Saarma, 2000). Nagu eespool mainitud, vahendab GDNF-i morfogeneetilist aktiivsust retseptorite kompleks, kuhu kuuluvad türosiinkinaas Ret ja GDNF-i koretseptor GFR α 1, mis on raku pinnale kinnitunud glükosüülfosfatidüülinositool (GPI) silla kaudu ja ei saa üksinda signaale vahendada (Jing *et al.*, 1996; Treanor *et al.*, 1996; Eketjäll *et al.*, 1999). Wolff'i juha suunamise koha pealt oli GDNF rollist juba juttu, kuid veidi hiljem, hiirel 11,5 arengupäeval (Hellmich *et al.*, 1996), on ta detekteeritav metanefrilises mesenhüümis, kus ta on vajalik kusejuha punga

väljasopistumiseks Wolfffi juhast. GDNF on vajalik kusejuha punga rakkude ellujäämiseks ja proliferatsiooniks. Seega tuleb vastav signaal mesenhüümist ja mõjub Ret retseptorile, mis paikneb kusejuha punga epiteeli rakkudes (Moore *et al.*, 1996; Sariola ja Saarma, 1999).

Üldjoontes on Ret-i ja GDNF-i suhtes mutantsete hiirte neeru fenotüübid sarnased: normaalselt arenevad mesonefrilised tuubulid ja Wolfffi juha, puudub kusejuha (Moore *et al.*, 1996; Pichel *et al.*, 1996; Sanchez *et al.*, 1996). Heterosügootsus Ret-i suhtes mutantset morfoloogiat ei põhjusta (Schuchardt *et al.*, 1994/1996), samas kui heterosügootsetel GDNF hiirtel esineb defekte neeru arengus (Pichel *et al.*, 1996). GFR α 1 geeni null-mutandi fenotüüp sarnaneb eespool kirjeldatud GDNF ja Ret mutantsele fenotüübile ja on ilmne, et ka GFR α 1 geen on vajalik normaalseks neeru arenguks (Enomoto *et al.*, 1998; Cacalano *et al.*, 1998).

2.2.2 Wnt perekonna signaalmolekulid

Wnt perekonna geenid kodeerivad sekreteeritud glükoproteiine, mis on keskse tähtsusega selgroogsete embrüogeneesis, reguleerides nii rakkude proliferatsiooni kui osaledes ka koemustri kujundamisel ja organite morfogeneesis (Wodarz ja Nusse, 1998). Teadaolevalt ekspresseeritakse arenevas neerus viite Wnt perekonna geeni: Wnt-2b, Wnt-4, Wnt-6, Wnt-7b, Wnt-11 (Kispert *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 2001; Stark *et al.*, 1994). Rohkem on teada Wnt-11 ja Wnt-4 rollist neerus.

2.2.2.1 Wnt-11

Algselt lokaliseerub Wnt-11 mRNA terves kaudaalselt pikenevas Wolfffi juhas, kuid hiljem säilib tema ekspressioon üksnes selles juha osas, mis asub metanefrilise mesenhüümi vastas (Kispert *et al.*, 1996). Kusejuha punga kasvades nihkub Wnt11 ekspressioon punga tippudesse ja kaob kusejuha punga tüve osast. Ka edaspidi ekspresseerub ta kasvava kusejuha harude tippudes (Stark *et al.*, 1994), mis näitab, et Wnt-11 on kindel funktsioon reguleerida kusejuha harunemist (Kispert *et al.*, 1996). Wnt-11 puudumisel on harunemine ebanormaalne, mille tulemusena tekib neeru hüpoplaasia (Kispert *et al.*, 1996; Pepicelli *et al.*, 1997; Sainio *et al.*, 1997). Hiljuti on näidatud, et Wnt-11 on Ret/GDNF signaaliraja üks modulaatoritest. Nende signaalid on koostoimivad, et reguleerida kusejuha harunemist (Majumdar, 2003).

2.2.2.2 Wnt-4

Wnt-4 on vajalik epiteeli moodustumiseks indutseeritud metanefrilises mesenhüümis. Wnt-4 ekspresseerub kasvava kusejuha kõrval paiknevates mesenhüümi rakkudes, samuti ka nende järglastes, koma- ja S-kujulistes kehakestes (Stark *et al.*, 1994), lisaks on ta oluline veel epiteliaalsete torukeste tekkimisel (Kispert *et al.*, 1998). Wnt-4 homosügootsed mutandid surevad sünnijärgselt, kuna neil puuduvad neerud (Stark *et al.*, 1994).

2.2.3 Bmp7

Arenevas neerus leiduvatest sekreteeritavatest kasvufaktoritest on oluline veel Bmp7 (luu morfogeneetiline valk 7). Teda leidub mesonefrilises juhas ja tuubulites, neeru mesenhüümis, hiljem metanefrilistes koma- ja S-kujulistes kehakestes (Lyons *et al.*, 1995). Samuti ekspresseerub ta ka kusejuhas ja selle harudes. On näidatud, et Bmp7 inhibeerib tuubulite teket surudes alla mesenhüümi kondenseerumist ja vähendades WT-1 taset. Teada on, et tema toime on normaalne vaid koos FGF-2 (Dudley *et al.*, 1999). Samuti võivad Bmp-7 ja Wnt-4 üksteist vastastikku reguleerida (Lechner ja Dressler, 1997). Homosügootsed Bmp7 hiired surevad varsti pärast sündi, kuna neil on neer välja arenemata, sest puuduvad glomeerulid, heterosügootsed hiired arenevad normaalselt (Luo *et al.*, 1995). Paljud teised neeru arenguga seotud geenid ekspresseeruvad Bmp7-ga samades või külgnevates neeru osades, näiteks WT-1, Pax2 ja GDNF ekspressiooni tase tõuseb indutseeritud mesenhüümis ja püsib kondenseerunud mesenhüümis, millest moodustuvad neerutorukesed (Lechner ja Dressler, 1997).

2.3 Transkriptsioonifaktorid

2.3.1 WT1

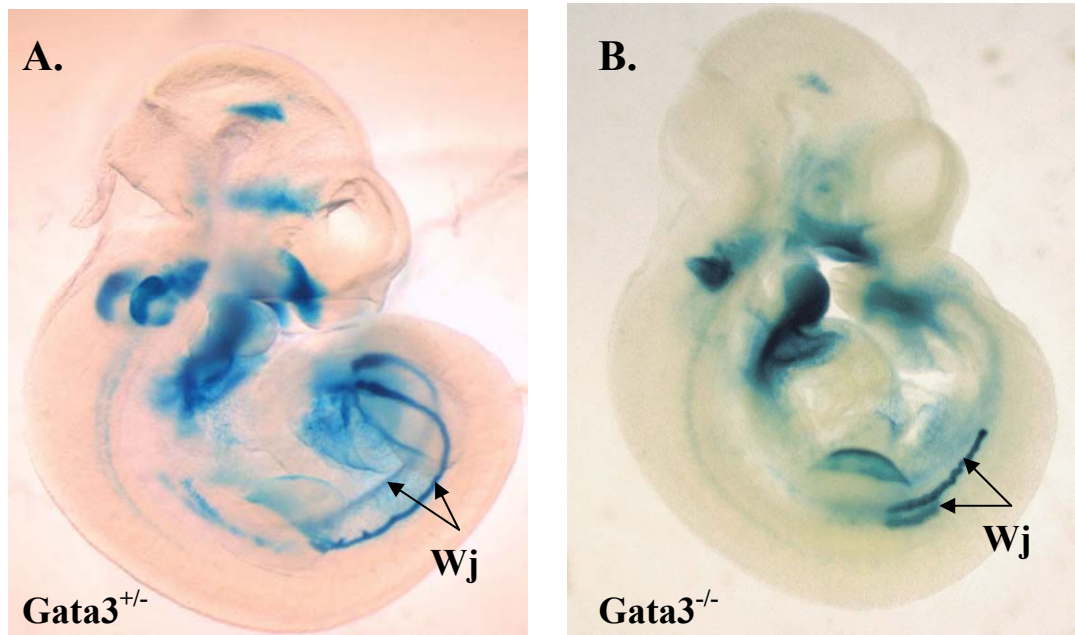
WT-1 (Wilmsi kasvaja valk 1) on tsinksõrme tüüpi transkriptsioonifaktor, mis seondudes oma äratundmisjärjestusele märklaudgeeni regulaatoralal, represseerib vastava geeni ekspressiooni. Urogenitaalsüsteemis võib WT-1 nõrka ekspressiooni esmalt juba indutseerimata mesenhüümis täheldada, induktsiooni järgselt see tugevneb. Lisaks ekspresseerub ta kaudaalsetes mesonefrilistes tuubulites ja metanefrilise mesenhüümi derivaatides, kuid mitte Wolffi juhas. Siiski on ta vajalik viimase induktsiooniks (Pritchard-

Jones *et al.*, 1990; Pelletier *et al.*, 1991; Armstrong *et al.*, 1992). WT-1 mutantsetel embrüotel ei arene mesonefrilised tuubulid. Metanefriline mesenhüüm algselt küll diferentseerub (Donovan *et al.*, 1999), kuid kuna kusejuha punga väljakasvu ei toimu, siis mesenhüüm sureb apoptoosi läbi (Kriedberg *et al.*, 1993; Lipschutz, 1998; Sainio *et al.*, 1997). Arvatakse, et WT-1 kontrollib signaalmolekulide ekspressiooni, mis reguleerivad kusejuha punga väljakasvu ja edasist harunemist, teisest küljest võib ta mõjutada kusejuha poolt tulevate signaalide vastuvõtmiseks vajalike retseptorite ekspressiooni (Sainio *et al.*, 1997). Sõltuvalt konkreetsest märklaudjärjestusest võib WT-1 käituda nii repressori kui aktivaatorina (Rupprecht *et al.*, 1994; Ryan *et al.*, 1995). WT-1 potentsiaalseid märklaudgeene on üsna palju. Neeru arengus on neist kriitilisema tähtsusega WT-1 geen ise (Rupprecht *et al.*, 1994) ja Pax2 (Ryan *et al.*, 1995).

2.3.2 Gata3

Üheks tähtsaimaks geeniks, mis reguleerib varaste neeru staadiumite arengut on Gata3 (Simon, 1995; Molkentin *et al.*, 1997; Koutsourakis *et al.*, 1999). Gata3 kuulub väiksesse transkriptsioonifaktorite perekonda, mis, nagu nimigi ütleb, seonduvad eelistatult GATA järjestust sisaldavale DNA motiivile (A/T)GATA(A/G) (Ko ja Engel, 1993; Merika ja Orkin, 1993). Kõik Gata faktorid (Gata1-9) on transkriptsiooni aktivaatoriteks (Yamamoto *et al.*, 1990). Nende seostumist DNA-ga vahendavad kõrgelt konserveerunud tsinksõrme struktuuriga domäänid (Yamamoto *et al.*, 1990; Ko ja Engel, 1993; Whyatt *et al.*, 1993).

Hiire embrüos on Gata3 ekspressioon esmalt detekteeritav ektoplatsentaalses koonuses umbes 8,5 arengupäeval, seejärel ilmub tema ekspressioon lõpuskaartes, nefrilises juhas, kloaagis, kesknärvisüsteemis (kesk-, taga- ja seljaajus), arenevas silmas, sisekõrvas, südames ning maksa hematopoeetilistes eellasrakkudes (George *et al.*, 1994; Lakshmanan *et al.*, 1999). Neeru arengus ekspresseeritakse Gata3 algselt Wolff'i juhas, hiljem ka mesonefroose kogumistorukestes. Metanefroose ekspresseeritakse Gata3 kusejuha pungas ning selle harudes. Gata3 ekspressioon püsib kogu kusejuha ulatuses ka täiskasvanud neerus (Labastie *et al.* 1995).



Joonis 3. Gata3 ekspressioonimuster 10,5 päeva vanustes loodetes. Looded on värvitud lacZ-ga. Joonisel A on kujutatud Gata3^{+/-} embrüo ja joonisel B Gata3^{-/-} embrüo. Näha on silmatorkav erinevus Wolffii juha pikenemises heterosügootse ja mutantse genotüübi vahel. Lisaks on mutantsetel loodetel täheldatav asümmeetria Wolffii juhade pikenemises – parempoolne juha ulatub kaudaalsemalt kui vasakpoolne. Wj - Wolffii juha.

Gata3 defitsiit hiires põhjustab varase embrüonaalse letaalsuse umbes 11. arengupäeval noradrenaliini puudumise tõttu, samuti kaasnevad tõsised defektid T-rakkude arengus, kesk- ja perifeerses närvisüsteemis, veresoontes, sisekõrvas ja maksa hematopoeetilistes eellasrakkudes (Pandolfi *et al.*, 1995; Hendriks *et al.*, 1999; Pata *et al.*, 1999; Lim *et al.*, 2000; Karis *et al.*, 2001). Hiire embrüote urogenitaalsüsteemis Gata3 puudumisel Wolffii juha siiski tekib pronefrilisest eellasest, kuid tema kaudaalne pikenemine katkeb ja juha ei kasva kunagi metanefrilisse mesenhüümi (joonis 3). Wolffii juha pikenemises on keha poolte vahel ka selge asümmeetria, st., et paremapoolne juha on alati kaugemale arenenud kui vasakpoolne (Jakobson *et al.*, avaldamata andmed).

Inimesel põhjustab GATA3 haplopuudulikkus hüpoparütüroidismi, südame defekte, immuunpuudulikkust, kurtust ja neeru väärarenguid (Van Esch *et al.*, 2000).

2.3.3 Pax2

Pax2 kuulub “paired box” motiivi sisaldavate transkriptsioonifaktorite perekonda (Lechner ja Dressler, 1997). Imetajatel on selles perekonnas 9 liiget: Pax1 - Pax9, mida ekspresseeritakse embrüogeneesis ja mis reguleerivad erinevate kudede morfogeneesi (Mansouri *et al.*, 1996; St-Onge *et al.*, 1995; Strachan ja Read, 1994). Selgroogsetel jaotatakse Pax-perekonna liikmed nelja alam perekonda, millest ühe moodustavad Pax2, Pax8 ja Pax5 (Pfeffer *et al.*, 1998).

Pax2 on loomariigis väga konserveerunud, sarnase funktsiooniga homolooge on lisaks imetajatele leitud veel nii kalades kui ka amfiibides (Heller ja Brändli, 1999; Pfeffer *et al.*, 1998). Hiires ekspresseeritakse Pax2 arenevas neerus, sisekõrvas ja silmas, samuti närvisüsteemi kudedes (nägemisnärvis, keskaju ja tagaaju liitekohas, seljaajus) (Lechner ja Dressler, 1997; Nornes *et al.*, 1990). Vahelmises mesodermis, piirkonnas, kus areneb neer, algab Pax2 ekspressioon juba 8,5-ndal arengupäeval, seega enne nefrilise juha moodustumist. Kana varases embrüos on tema ekspressioonimuster sarnane hiire omale (Obara- Ishihara *et al.*, 1999). Pax2 on teadaolevalt esimene neeruspetsiifiline geen, mille ekspressioon markeerib pronefroose moodustumist hiires (Bouchard *et al.*, 2000). Muudes urogenitaalsüsteemi osades ekspresseeritakse Pax2 kaudaalselt pikenevas nefrilises juhas, mesonefroose epiteliaalsetes tuubulites, kusejuhas, kondenseeruvates metanefrilises mesenhüümis, kogumistorukestes ja metanefroose diferentseeruvates nefronites. Neeru edasises arengus reguleeritakse Pax2 tase alla (Dressler *et al.*, 1990; Dressler ja Douglass, 1992; Torres *et al.*, 1995). Metanefrilises mesenhüümis ekspresseeritakse Pax2 juba enne selle indutseerimist kusejuha punga poolt. Pax2 mutantsete hiirte fenotüübiline ja geneetiline analüüs on näidanud, et indutseerimata mesenhüümis vajatakse Pax2-te GDNF-i ekspressiooniks. Pax2 regulatsioon GDNF-i ekspresseerimisel näitab, et Pax2 kontrollib mesenhüümase mustri kujunemist, aga ka nefrilise juha epiteeli signaliseerumist arenevas neerus (Torres *et al.*, 1995).

Pax2 mutantsetel hiirtel puuduvad mesonefrilised tuubulid ja neerud, kuna kusejuha pung ei harune Wolffii juhast, samuti puuduvad genitaaltrakti need osad, mis on pärit vahelmisest mesodermist: emastel munajuhad, emakas ja tupp, isastel viimajuhad, munandimanus, seemnejuhad ja seemnevesiikul. Pax2 tähtsus urogenitaalsüsteemi arengule ilmneb ka sellest, et heterosügootsus selle faktori suhtes põhjustab normaalsest väiksemate ja hüpoplastiliste neerude tekke (Dressler *et al.*, 1990; Torres *et al.*, 1995; Sanyanusin *et al.*, 1995; Favor *et al.*,

1996). Intrigeeriv on ka asjaolu, et vaatamata tema varasele ekspressioonile, areneb Pax2 mutantsetes embrüotes siiski mesonefriline juha, mis aga ei pikene metanefrilisse mesenhüümi tema kiire degeneratsiooni tõttu (Torres *et al.*, 1995). Need defektid on sarnased Gata3 mutantsete embrüotega (Jakobson *et al.*, avaldamata andmed). Bouchard kaasautoritega on näidanud, et varane Pax2 sõltumatu Pax8 ekspressioon kompenseerib Pax2 kao neeru arengu alguses (Bouchard, 2002). Pax2 ektoopiline üleekspressioon põhjustab epiteeli hüperprolifereerumist ja tsüstide tekke (Dressler *et al.*, 1993).

Pax2 on ka WT1 märklaudgeen. Normaalselt on neeru arengus WT1 ja Pax2 valkude tasemetes vastupidine korrelatsioon. Struktuurides, kus Pax2 tase allareguleeritakse, tõuseb WT1 tase. Selline vastastikune interaktsioon toimub ka nefroni diferentseerudes, kus glomeeruli osas surutakse Pax2 alla (Ryan, 1995; Scharnhorst *et al.*, 2001). Pax2 ekspresseerub ka primaarses Wilmsi tuumoris ja tuumorist pärit rakuliinides (Tagge *et al.*, 1994). Inimese Wilmsi tuumoris püsib Pax2 ekspressioon epiteliaalsetes osades (Dressler ja Douglass, 1992; Eccles *et al.*, 1992), mis lubab oletada, et Pax2 negatiivsed regulaatorid on inaktiivsed (Ryan, 1995).

Inimestel põhjustab PAX2 geeni heterosügootne mutatsioon neeru-koloboomi sündroomi, mida iseloomustab nägemisnärvide ebanormaalsus ja neeru puudulikkus, mille tulemuseks on väikesed hüpoplastilised neerud (Sanyanusin *et al.*, 1995; Cunliffe *et al.*, 1998). Sarnast haplopuudulikkuse fenotüüpi on täheldatud ka heterosügootsetel hiirtel, mis näitab, et silmanärvi ja metanefrose areng sõltuvad Pax2 ekspresioonitasemest (Keller *et al.*, 1994; Torres *et al.*, 1995; Favor *et al.*, 1996; Otteson *et al.*, 1998).

2.3.4 Pax8

Pax8 avastati hiire „paired-box“ transkriptsioonifaktorite perekonnast kõige viimasena. Ta on kõrgelt homoloogiline Pax2-ga. Mõlemad geenid on arenevas hiire neerus osaliselt kattuva ekspressioonimustriga (Plachov *et al.*, 1990). Pax8 käitub kui transkriptsiooni kontrolliv faktor (Zannini *et al.*, 1992). Lisaks neerule ekspresseeritakse teda arenevas kilpnäärmes, sisekõrvas ja kesk- ning tagaaju liitekohas (Bouchard *et al.*, 2002; Pfeiffer *et al.*, 1998; Plachov *et al.*, 1990). Pax8 nagu ka Pax2, ei ekspresseerita diferentseerumata ega kondenseerumata mesenhüümirakkudes (Poleev *et al.*, 1992). Pax8 on kõige varasem teadaolev markergeen hiire varase neeru arengus, tema ekspressioon on täheldatav juba 6-7

somiidi staadiumis (Pfeffer *et al.*, 1998; Bouchard *et al.*, 2002). Huvitav on see, et neeru organogenees on Pax8 mutantsetes hiirtes normaalne, küll aga surevad nad postnataalselt kilpnäärme arengu defektide tõttu (Mansouri *et al.*, 1998). Arvati, et Pax2 kompenseerib Pax8 puudumist Pax8 suhtes mutantsete embrüote neeru arengus. Selle selgitamiseks ristati Pax8 ja Pax2 heterosügootseid hiiri. Analüüsid Pax2/8 topeltmutantseid embrüoid, näidati, et nimetatud kahel transkriptsioonifaktoril on üliolulised funktsioonid neeru arengus. Nad on koos olulised pro- ja mesonefroose tekkimises, kuna topeltmutantsetes embrüotes polnud vahelduv mesoderm suuteline läbima mesenhüüm-epiteel konversiooni. Selle tulemusena ei teki nefrilist juha, samuti ei ekspresseerita varase neeru arengu spetsiifilisi geene Ret-i ega Lim1-te (Bouchard *et al.*, 2000; Bouchard *et al.*, 2002). M. Jakobson on näidanud, et ka Pax8 võib kompenseerida Pax2 kao migreeruvates Wolffii juha rakkudes ja säilitada tänu sellele madala Gata3 ekspressiooni taseme Pax2 mutantsetes hiirtes 9,5 arengupäeval. See võib olla ka seletuseks, miks Pax2 mutantsetes embrüotes ilmneb vähem tõsine Wolffii juha migratsiooni häire kui Gata3 mutantsetes embrüotes. Pax2/8 mRNA koekspressiooni muster ja mutantsete hiire embrüote fenotüübid näitasid, et need geenid paiknevad Gata3-st ülesvoolu samas geneetilises rajas (Jakobson *et al.*, avaldamata andmed). Transkriptsioonifaktorid Pax2/8 kontrollivad ühiselt urogenitaalsüsteemi arengut, reguleerides mesenhüüm-epiteel konversiooni vahelmises mesodermis (Bouchard *et al.*, 2002).

2.4 Apoptoos neeru arengus

Neeru arenguga kaasneb paljude rakkude programmeeritud surm ehk apoptoos. Suurem rakkude suremine leiab aset metanefrilises mesenhüümis, piirkondades, kus puuduvad induktiivsed signaalid (Koseki *et al.*, 1992), mis tavaliselt kontrollivad nii rakkude ellujäämist kui ka nende diferentseerumist. Apoptootilisi rakke võib peamiselt leida moodustuvate nefronite vahelises mesenhüümis, aga ka kondenseeruvate kehakeste kõrval (Koseki *et al.*, 1992; Coles *et al.*, 1993). Hilisemas neeru arengus esineb rakkude surma sünnijärgselt kusejuha harudes (Coles *et al.*, 1993).

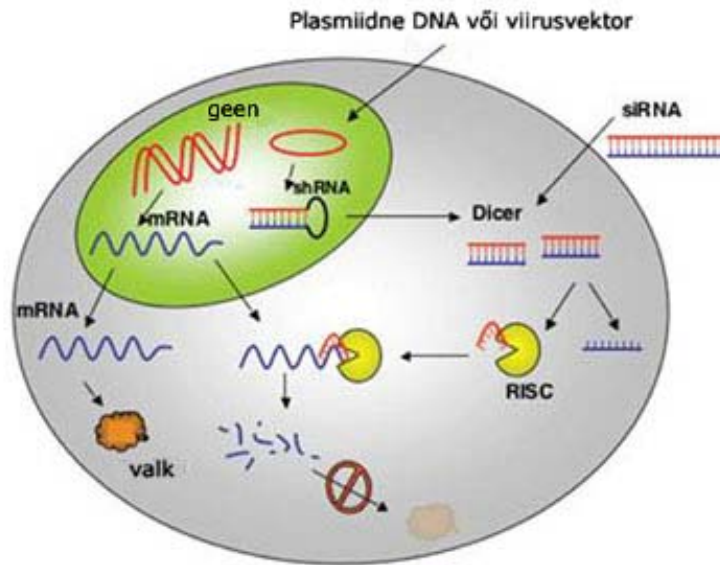
Üheks teadaolevaks faktoriks, mis kontrollib neerus apoptoosi, on supressorgeen bcl-2 produkt (Nunez ja Clarke, 1994). Hiired, kellel vastav valk puudub, arenevad tsüstilised neerud, mis on hüpoplastilised ja koosnevad normaalsest väiksemast arvust nefronitest. Apoptoosi regulatsioon on vajalik normaalse neeru arenemiseks ja bcl-2 võib blokeerida apoptoosi paljudes neeru rakutüüpides (Lechner ja Dressler, 1997).

2.5 RNA interferents

Geneetiliste *knockout* hiirte loomine kasutades embrüonaalseid tüvirakke, on saanud üheks võimsaimaks tehnoloogiaks, mis võimaldab tundma õppida imetajate arengu molekulaarset geneetikat. Paljude projektide jaoks on see kindlasti ideaalne meetod, kui mitte arvestada tema kallidust (Davies *et al.*, 2004). Samas pole selliselt loodud mutandid tihti sobivad uurimaks geenide funktsioone, mida vajatakse paljudes erinevates arengustaadiumides. Embrüod surevad või on ebanormaalsed kohe esimeses staadiumis, kus vastavat geeni vajatakse, muutes seetõttu võimatuks hilisemate sündmuste jälgimise. Edenenud transgeensed tehnoloogiad, nagu näiteks cre-lox süsteem (Gu *et al.*, 1994; Kuhn *et al.*, 1995), võivad küll täiustada klassikalist *knockout* meetodit, kuid sõltuvad koespetsiifilistest promootoritest, mis pole alati kättesaadavad varase arengu jooksul, enne rakkude diferentseerumist organspetsiifilisel viisil.

Viimase kümne aasta jooksul on esile kerkinud RNA interferents (RNAi), kui loomupärane meetod geeni ekspressiooni post-transkriptsiooniliseks vaigistamiseks, mis toimub vastusena kaheaheelise RNA (dsRNA) rakku viimisele (Fire *et al.*, 1998; Zamore, 2001). RNAi fenomen avastati esmalt varbussis *C. elegans* Mello ja tema grupi poolt, mis näitas, et süstides pikka dsRNA-d *C. elegans*'i, põhjustati vastava mRNA järjestuse spetsiifiline degradatsioon (Fire *et al.*, 1998). Selliselt on põhimõtteliselt võimalik inhibeerida iga geeni ekspressiooni soovitud ajal (Elbashir *et al.*, 2001; Harborth *et al.*, 2001). Väikesed interfereeruvad RNA-d (siRNA-d) mõjutavad ainult märklaudgeenide ekspressiooni, ilma et mõjutataks mitteasjakohaste geenide avaldumist (Davies *et al.*, 2004).

Kuigi RNAi töötab hästi erinevates organismides, osutus geenide vaigistamine RNAi poolt küllaltki raskelt detekteeritavaks eelkõige imetajates, seda just dsRNA sõltuvate valkude mittespetsiifilise inhibeerimise tõttu, mis on osa peremeessüsteemist, et kaitsta ennast viiruste infektsioonide eest. Kuid mõned aastad tagasi näitasid Tuschl ja tema kolleegid, et 21 või 22 nt-lised RNA-d 2-nt 3' üleulatuvate otstega suudavad indutseerida geeni vaigistamist, ilma et toimuks translatsiooni mittespetsiifilist inhibeerimist imetajate koekultuuri rakkudes (Caplen *et al.*, 2001; Elbashir *et al.*, 2001).



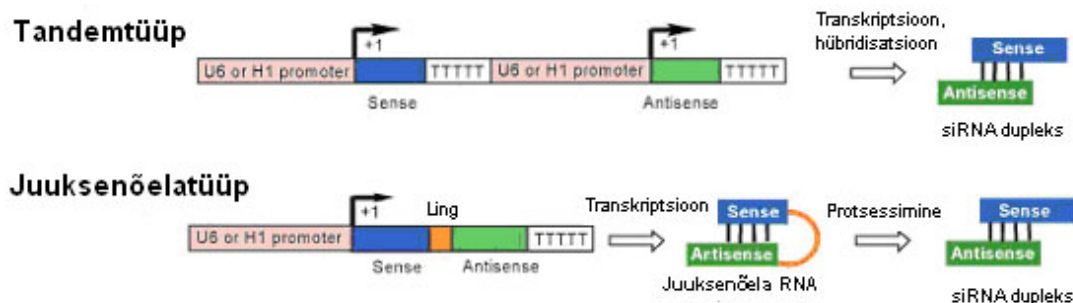
Joonis 4. Ülevaade RNA interferentsist. Plasmiidse DNA või viirusvektori viimisel raku sünteesitakse tuumas shRNA, mida modifitseeritakse ensüümi Dicer poolt. Järgnevalt seondub shRNA *antisense* ahel komplementaarselt märklaudgeeni mRNA-le, põhjustades viimase lagundamise RISC kompleksi poolt. RNAi efekti saab esile kutsuda ka lihtsalt siRNA-de viimisega raku nagu näidatud joonisel paremal.

RNA interferents on kõrgelt konserveerunud mehhanism kõikides elusorganismides (Maine *et al.*, 2000). RNAi toimib mitmeastmelise protsessina: sisenedes raku protsessitakse pikk dsRNA 21-23 nukleotiidilisteks aktiivseteks 2 nukleotiidiliste üleulatuvate 3' otstega siRNA dupleksiteks RNaseIII ensüümi Dicer poolt (Mocellin *et al.*, 2004). See funktsionaalne dimeer sisaldab helikaasi ja dsRNA-ga seostumise domääne, mis on olulised dsRNA lahtiharutamiseks ja vahendavad valk-RNA interaktsioone (Bernstein *et al.*, 2001). Pärast seda liidetakse siRNA-d multikomponendilise nukleasid kompleksiga RISC (RNA-induced silencing complex), mis tunneb siRNA-ga homoloogsed mRNA järjestused ja põhjustab nende hävitamise (Hammond *et al.*, 2001; Montgomery *et al.*, 1998; Nykanen *et al.*, 2001). Geeni ekspressioon inaktiveeritakse post-transkriptsiooniliselt (Mocellin *et al.*, 2004; joonis 4).

Teostamaks pikaajalist geeni vaigistamist, loodi aastal 2002 kahe grupi poolt DNA-l põhinevad vektorid, mis ekspresseerivad shRNA-d (*small hairpin* RNA) RNA polIII promootori alt (Brummelkamp *et al.*, 2002; Paddison *et al.*, 2002; joonis 5). Selliste vektorsüsteemide puhul kasutatakse RNA polIII promootoreid, nagu U6, H1 ja tRNA, ning kogu süsteem on jagatud kahte klassi, ekspresseeritav RNA on kas tandem- või juuksenõela-tüüpi:

1) Tandemtüüpi siRNA ekspressioonivektor sisaldab nii *sense* kui *antisense* RNA-d, mida transkribeeritakse kahe sõltumatu RNAPolIII promootori kontrolli alt. Hiljem anniilitakse *sense* ja *antisense* RNA ahelad kokku ja moodustuvad siRNA dupleksid.

2) Juuksenõelatüüpi shRNA ekspressioonivektor disainitakse juuksenõela RNA transkriptsiooni jaoks, mis hiljem protsessitakse siRNA dupleksiteks sisemise RNAas III poolt (Miyagishi *et al.*, 2004). Välja on pakutud kaks võimalust: Brummelkamp kaasautoritega (Brummelkamp *et al.*, 2002) näitas, et 19 bp juuksenõela RNA-l, millel on 9 nukleotiidiline ling, vaigistab efektiivsemalt kui lühema linguga RNA. Miyagishi kaasautoritega (Miyagishi *et al.*, 2004) leidis, et hoopis mikroRNA-st (miRNA) pärit lingu järjestusega shRNA ekspressioonivektoril on kõrgeim vaigistamise aktiivsus. shRNA viimine embrüotesse omab võimet alla suruda arengus oluliste geenide ekspressiooni ja vähendada silmnähtavalt aega, mida vajatakse individuaalsete geenide funktsioonide uurimiseks arengu jooksul (Paddison ja Hannon, 2002). shRNA-d viiakse organismi kas eksogeenselt, süstides hiire saba veeni, või sünteesitakse *in vivo* RNA polIII promootori poolt (Paddison *et al.*, 2002).



Joonis 5. Skemaatiline pilt tandem- ja juuksenõelatüüpi siRNA ekspressioonivektoritest. Tandemtüübi puhul transkribeeritakse nii *sense* kui *antisense* ahel erinevate promootorite alt. Seejärel *sense* ja *antisense* RNAd anniilitakse ning moodustub 4 nukleotiidiliste üleulatuvate 3' otstega siRNA dupleks. Juuksenõelatüübi puhul ekspresseeritakse *sense* ja *antisense* nukleotiide ühtse tervikuna. Transkribeeritud RNA moodustab juuksenõelastruktuuri, mis protsessitakse siRNA dupleksiks nagu joonisel näidatud (Miyagishi *et al.*, 2004).

Palju on hakatud kasutama ka viirusvektoreil põhinevat RNAi-d. Adeno- ja retroviirusvektorid toodavad samuti siRNA-sid *in vivo* (Shen *et al.*, 2003; Stewart *et al.*, 2003) ja saavutatakse stabiilne RNAi (Brummelkamp *et al.*, 2002).

siRNA süntees, puhastamine ja anniilimine tööstuslike keemiliste protsesside käigus (Elbashir *et al.*, 2001a) on võitnud kiiresti populaarsust, kuna see on lihtne, kiire ja odav geenide selektiivse inhibeerimise meetod, millel arvatakse olevat suur edu (Yang *et al.*, 2002). Ajakirja "Science" toimetajad nimetasid seda suurepärase avastuse „Läbimurdeks aastal 2002“. Nende arvates on see avanud uue ukse geneetilisteks uuringuteks ja teraapiaks (Couzin, 2002). Teadlased kasutavad praegu RNAi tehnoloogiat, et paremini mõista bioloogilisi mehhanisme nii normaalsetes kui pahaloomulistes rakkudes. Üheks peamiseks eesmärgiks on lahendada transformatsiooni müsteerium ja täiustada vähiteraapiat (Silva, 2004). RNAi areneb kiiremini kui iial varem (McManus, 2002).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 TÖÖ EESMÄRGID

RNA interferentsi meetod on leidnud viimasel ajal laialdast kasutamist mitmete arengubioloogiliste küsimuste selgitamisel. RNAi eeliseks klassikaliste meetodite ees on suhteline odavus ja vähene ajakulu tulemusteni jõudmisel. Samas on ta kõrge spetsiifikaga ja efektiivne geeniekspressiooni vaigistamisel. Üheks töö eesmärgiks oligi RNAi metoodika juurutamine meie laboris.

Teiseks eesmärgiks oli uurida RNA interferentsi efektiivsust ja spetsiifilisust geenivaigistamisel rakukultuuris, kasutades Gata3 ja Pax8 spetsiifilist shRNAd kodeerivaid plasmide.

Kolmandaks soovisime, kasutades RNAi-d, uurida transkriptsioonifaktor Gata3 rolli hilises neeru arengus *in vivo*. Klassikalise *knockout* meetodiga on see võimatu, kuna Gata3 mutantsetel loodetel ei toimu metanefrose induksiooni ja looted hukuvad u. 11. arengupäeval.

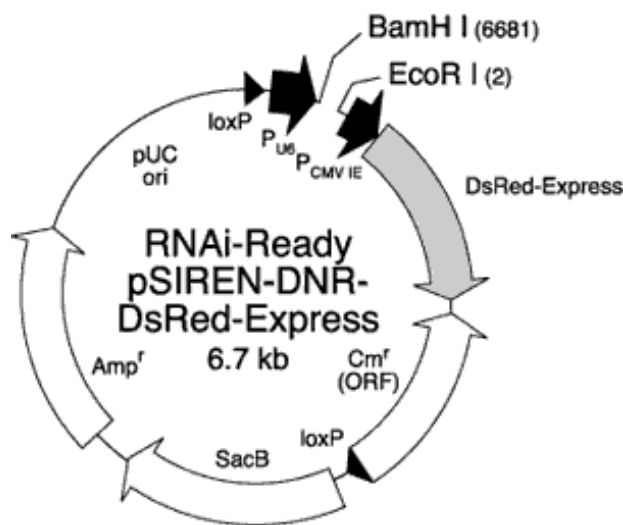
Neljandaks eesmärgiks oli luua efektiivne ajaliselt kontrollitav geenivaigistamise meetod Pax8 ekspressiooni vaigistamiseks hiire embrüonaalses arengus.

2.2 MATERJAL JA METOODIKA

2.2.1 Kloneerimine

2.2.1.1 shRNA ekspressioonivektori konstrueerimine

Töös kasutati vektorit RNAi-ready pSIREN-DNR-DsRed-Express (BD Biosciences, joonis 6), mis on spetsiifiliselt disainitud shRNA-de ekspresseerimiseks inimese U6 promootori alt. Sõltuvalt eksperimendist ligeerisin vektori *Bam*HI ja *Eco*RI saitidesse eelnevalt anniilitud Gata3- või Pax8-spetsiifilised DNA oligonukleotiidid, millelt transkribeeritav shRNA vaigistab vastavate märklaudgeenide endogeenset ekspressiooni. Oligonukleotiidide järjestuste valimiseks kasutati siRNA disainimise programmi siSearch, mis võtab arvesse ka teiste gruppide RNAi otsimise kriteeriumeid (Chalk *et al.*, 2004).



Joonis 6. RNAi-ready pSIREN-DNR-DsRed-Express vektor. Vektor on disainitud shRNA ekspresseerimiseks imetajate rakkudes. shRNA-d kodeeriv järjestus ligeeritakse *Bam*HI ja *Eco*RI saitidesse, inimese U6 promootori alla. Samuti sisaldab vektor reportergeenina dsRed-Expressi, mis paikneb CMV promootori kontrolli all.

Kasutatud oligonukleotiidide järjestused:

1. Gata3RNAi - edaspidi töös kasutatud plasmidi tähistusena, mis kodeerib Pax8 spetsiifilist shRNA-d. shRNA-d kodeeriv järjestus on disainitud Gata3 mRNA (NCBI geenipanga nr. BC062915) 288-306 piirkonna vastu.

Forward *sense* *ling* *antisense*
 5' - GATCCCCGTGCATGGAGGTTCCGGTAGTGTGCTGTCCTACTGAGCTTCCATGTACGTTTTTG - 3'
Reverse
 5' - AATTCAAAAACGTACATGGAAGCTCAGTAGGACAGCACACTACCGAACCTCCATGCACGGG - 3'

2. Pax8RNAi – edaspidi töös kasutatud plasmidi tähistusena, mis kodeerib Pax8 spetsiifilist shRNA-d. shRNA-d kodeeriv järjestus on disainitud Pax8 mRNA (NCBI geenipanga nr. BC020526) 368-386 piirkonna vastu.

Forward *sense* *ling* *antisense*
 5' - GATCCCCGGTGTTGGCTCCATCAAGTGTGCTGTCCTTGATGGAGCTGACACTGGTTTTTG - 3'
Reverse
 5' - AATTCAAAAACCAAGTGTGCTCAGCTCCATCAAGGACAGCACACTTGATGGAGCCAACACCGGG - 3'

Oligonukleotiidid disainiti selliselt, et *sense* ja *antisense* järjestused oleks ühendatud omavahel 11-nukleotiidilise (GTGTGCTGTCC) miRNA-st pärit linguga. *Sense* ahel sisaldab kolme või nelja C ja T punktmutatsiooni (rasvases kirjas), et tagada optimaalne s.t. mutatsioonivaene kasv bakteris (Miyagishi *et al.*, 2004). *Forward* ja *reverse* ahela 5' otsa lisati *Bam*HI (GATCC) ja *Eco*RI (AATTC) järjestused (allajoonitud), mida vajati kloneerimisel. *Forward* ahela lõppu lisati terminatsioonijärjestus T₅. Kõikide konstrueeritud plasmiidide järjestusi kontrolliti restriksioonanalüüsiga ja nendest positiivseid ka sekveneerimisega.

2.2.2 Koekultuur

2.2.2.1 Rakuliinid

Töös kasutasin HeLa (emakakaela vähkkasvaja) rakke, mida kasvasin IMDM söötmes (Iscove's modified Dulbeccos's medium, Gibco), mis sisaldas 10% veise loote seerumit (Gibco), penitsilliini 100 ng/ml ja streptomütsiini 100 ng/ml. Rakke inkubeerisin koekultuuri tassidel 37° C ja 5% CO₂ sisalduse juures.

2.2.2.2 Transfektsioon

HeLa rakke transfekteerisin transientselt elektroporatsiooni meetodil reporterplasmiididega pcDNA3.1 või pcDNA3, mis sisaldab, vastavalt kas Gata3 või Pax8 kodeerivaid järjestusi koos shRNA-d ekspresseerivate plasmiididega Gata3RNAi või Pax8RNAi, vahekorras 1:10

(0,1µg/1µg). Negatiivse kontrollina kasutasin lutsiferaasiRNAi-d (lucRNAi), positiivse kontrollina vastavat reporterplasmidi. Konstruktid elektroporeerisin ("BioRad" Gene Pulser II) rakkudesse, pingel 200 V ja kondensaatori mahtuvusel 975 µF. Rakke kasvasin koekultuuri tassil 37°C juures 5% CO₂ tingimustes 48 tundi.

2.2.3 Pöördtranskriptsioon-polümeraas-ahelreaktsioon (RT-PCR)

2.2.3.1 RNA eraldamine HeLa rakkudest

48 tundi pärast transfekteerimist lüüsisin HeLa rakud ja eraldas RNA. Selleks eemaldas rakkudest söötme, pesin PBS lahusega ja lüüsisin TRIzol (Life Technologies) reagentiga. Lüsandi kogusin mikrotsentrifuugi tuubi, lisasin üldmahust ¼ osa kloroformi, segasin vorteksil ja tsentrifuugisin (14000 p/min, 20°, 15 min., Eppendorf, Centrifuge 5417C). Pärast tsentrifuugimist tekkis tuubi kaks faasi: vesi- ja kloroformifaas. RNA jääb ainult ülemisse vesifaasi. Ettevaatlikult eemaldas vesifaasi uude tuubi, seejärel lisasin RNA väljasadestamiseks algsest üldmahust ½ osa isopropüülalkoholi, keerasin tuubi üles-alla mõned korrad, hoidsin 10 minutit toatemperatuuril ja tsentrifuugisin (14000 p/min, 20°C, 10 min.). Eemaldas supernatandi, pesin sadet 70% etanooliga ning tsentrifuugisin (7500 p/min, 20°C, 5 min.). Pärast etanooli eemaldamist lasin sademel toatemperatuuril kuivada ja lahustasin 20µl 1X TE-s. Saadud produkti kontsentratsiooni mõõtsin spektrofotomeetriga.

2.2.3.2 Pöördtranskriptsioon

RNA pealt cDNA sünteesimiseks kasutasin M-MuLV pöördtranskriptaasi (Fermentas) ja sellega kaasasolevaid lahuseid. Ühe reaktsiooni kohta võtsin 4µg totaalselt RNA-d ja 0,5µg oligo(dT)₁₈ praimerit ning viisin mQ-veega reaktsioonimahuni 11µl. Praimerite paardumiseks inkubeerisin segu 5 minutit 70°C juures ning jahutasin jääl. Seejärel lisasin 4µl 5X reaktsioonipuhvrit, 2µl 10mM dNTP, 20 ühikut ribonukleaaside inhibiitorit ning viisin veega lõppmahuni 19µl. Reaktsioonisegu inkubeerisin 37°C juures 5 minutit, lisasin 200 ühikut M-MuLV pöördtranskriptaasi. Järgnevalt inkubeerisin reaktsioonisegu 1h 42°C juures, reaktsiooni peatasin kuumutades proove 70°C juures 10 minutit.

2.2.3.3 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

Kontrollimaks, kas RNAi viib transientselt kotransfekteeritud rakkudes spetsiifiliselt alla oma märklaudgeenide ekspressiooni taset, kasutasin polümeraasi ahelreaktsiooni, mis sisaldas 1µl RT-PCR produkti, 2µl 10X PCR puhvrit (Fermentas), 1,2µl 25mM MgCl₂, 2µl 2mM dNTP, 12,6µl mQ, 0.4 U *Taq* DNA polümeraasi ja 0,2µM kumbagi praimerit.

Gata3 puhul

5'- AGCCGGCTGGGTGAGCCA-3' (ex2F)

5'- CGTGGTGGATGGACGTCTTG - 3'(ex3R)

ja Pax8 puhul

5'- ATCATCCGGACCAAAGTGCA-3' (ex5F)

5'- GGCTGAAGGTGTCCGTACGA-3'(ex7R).

Amplifikatsioonireaktsioon toimus järgmistel tingimustel: algne denaturatsioon 94°C 3 minutit, denaturatsioon 94°C 30 sekundit, praimerite seundumine 60°C 30 sekundit, ekstensioon 72°C 40 sekundit, inkubatsioon 72°C 3 minutit. Gata3 puhul läbis PCR 21 tsüklit, Pax8 puhul 27 tsüklit. Sisemise kontrolli järgi normaliseeritud geelibändide intensiivsust võrdlesin programmiga Quantity One 4.1.1.

2.2.4 Immuunoblot

48 tundi pärast kotransfektsiooni eemaldasini koekultuuri 6-augulistelt tassidelt söötme, pesin rakke 3 korda PBS-ga ning lüüsisin 2X SDS lüüsipuhvris (50 mM TrisCl (pH 6,8), 100 mM DTT, 2% SDS, 0,1% broomfenoolsinine, 10% glütserool). Lüsaadi kogusin mikrotsentrifuugi tuubi ning kuumutasin 100°C juures 10 minutit. Rakkude totaallüsaat fraktsioneeriti elektroforeesil 10% SDS polüakrüülamiidgeelis 1X SDS puhvris (125 mM Tris, 960 mM glütsiin, 0,5% SDS). Ülekanne toimus *semy dry* meetodil PVDF filtrile (Immobilon-P, “Millipore Corporation”). Enne ülekannet märgasin filtri metanoolis ning seejärel hoidsin koos geeliga 10 minutit *semi dry* ülekandepuhvris (48 mM Tris, 39 mM glütsiin, 0,037% SDS, 20% etanool). Ülekanne kestis 45 minutit 15 V juures (Transblot SD, “BioRad”). Seejärel panin filtri 4% blokeerimislahusesse (2g lõssipulbrit 50 ml PBS/Tween’is) ning inkubeerisin 1 tund toatemperatuuril. Gata3 ja Pax8 vastase antikeha lisasin 10 ml 2% blokeerimislahusesse lõppkontsentratsiooniga 1µg/ml ning inkubeerisin 1 tund toatemperatuuril. Primaarse antikehana kasutasin 6X His Ab-d (M.Jakobsoni käest). Sekundaarse antikehana peroksüdaasiga konjugeeritud hiire immunoglobuliin G (IgG) vastast

kitse IgG-d (saadud M.Pooga käest). Sekundaarse antikeha lisasin 10 ml sekundaarse antikeha puhvrissi (0,6 g BSA *fraction V* lahustatud 20 ml PBS/Tween'is) lahjendusega 1:10000. Inkubeerisin toatemperatuuril 1 tund ning pesin kaks korda 15 minutit PBS/Tween'iga ja kolm korda 5 minutit pesulahusega (150 mM NaCl, 0,1% Tween, 50 mM Tris). Detekteerimiseks kasutasin kommertsiaalset kitti ECL RPN 2106 ("Amersham Pharmacia Biotech").

2.2.5 Hiirte liinid

Töös kasutasin kahte genereeritud Gata-3 hiireliini: Gata-3^{nslacZ} ja Gata-3^{taulacZ}, millel oli eelnevalt suunatud mutageneesiga Gata3 geeni lookusesse viidud lacZ reportergeen (Hendriks et al., 1999). Mõlemas hiireliinis ekspresseerub β -galaktosidaas Gata-3 regulaatorelementide kontrolli all ning kuna lugemisraam on rikutud, siis funktsionaalset Gata-3 valku ei toodeta. Hiireliinid erinevad sellepolest, et Gata-3^{nslacZ} loomades akumulereb β -galaktosidaas tänu tuumalokalisatsiooni signaalile raku tuuma, kuid Gata-3^{taulacZ} produkt transporditakse tsütoplasmasse. Käesolevas töös kasutasin mõlemaid hiireliine, kuna reportervalgu asukoht rakus polnud oluline. Lisaks nimetatutele kasutasin ka Pax2^{+/-} hiireliini (Torres et al., 1995). Hiirte viljastumise toimumine määrati vaginaalse limakorgi tekkimise abil. Lõuna, mil detekteeriti limakork, võeti loodete vanuseks 0,5 päeva (d.p.c).

2.2.6 Sabaveeni süstimine

Sabaveeni süstimine viidi läbi kahel meetodil. Ühel juhul lahjendasin plasmiidid (20 μ g) 180 μ l Ringeri puhvriss (6,5g NaCl, 0,42g KCl, 0,25g CaCl₂ 1 liitris mQ-s) ja süstisin erineva tiinusevältega anesteseerimata hiire sabaveeni. Teisel juhul valmistasin enne *in vivo* süstimist DNA-liposoomi kompleksid, kasutades järgnevat meetodit. Kõigepealt lahjendasin ühes tuubis plasmiidid (20 μ g) 180 μ l steriilses PBS-s, teises tuubis aga 150 μ l PBS-s 50 μ l DMRIE-C reagenti (1,2-dimüristüül-oksüpropüül-3-dimetüül-hüdroksüetüül-ammonium-bromiid ja kolesterool, Invitrogen) ja segasin. Saadud segu lisasin tilkhaaval DNA-PBS lahusele ja suspendeerisin süstlaga sisse-välja tõmmates 3-5 korda. Lahust inkubeerisin 5-7 minutit toatemperatuuril ning vahetult enne süstimist pöörasin tuubi veel paar korda üle otsa. Mõlemal juhul kasutasin süstimiseks 1ml insuliinisüstalt ja nõela läbimõõduga 29G.

2.2.7 β -galaktosidaasi töötlus

Embrüod dissekteerisin emakasarvest fosfaatpuhvri soolalahuses (PBS), eemaldasid ekstraembrüonaalsed koed. Iga loote rebukoti säilitasin 1,5ml tuubis polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) otstarbeks. Looded fikseerisin 4% paraformaldehüüd/PBS lahuses (PFA) 1 tund 4°C juures, misjärel pesin neid kolm korda 15 minutit 0,1M fosfaatpuhvris pH 7,3. Pärast pesu värvisin looteid samas puhvris, millele lisasin veel 5mM $K_3Fe(CN)_6$, 5mM $K_4Fe(CN)_6$ ja 5-bromo-4-klooro-3-indolüül- β -galaktopüranosiidi (Xgal) 1mg/ml kohta pimedas üleöö toatemperatuuri juures. Värvunud embrüoid loputasin kolm korda 15 minutit PBS-s ja järelfikseerisin 4% PFA-s 4°C juures üleöö.

2.2.8 mRNA *in situ* hübridisatsioon

Koguloote *in situ* hübridisatsiooni teostasid järgides Wilkinson'i protokollid (Wilkinson, 1992), millesse olid sisse viidud mõningad muudatused. Gata3 ja Pax8 *sense* ja *antisense* riboproovid sünteesisin vastavate lineaariseeritud plasmiididelt kasutades digoksygeniiniga (DIG) (Roche) märgistatud U-nukleotiidide. Spetsiifilise märgise detekteerisin hübridiseerimisjärgselt DIG-vastase antikehaga konjugeeritud aluselise fosfataasiga (AP) ilmutades looteid NBT/BCIP (Boehringer) lahuses.

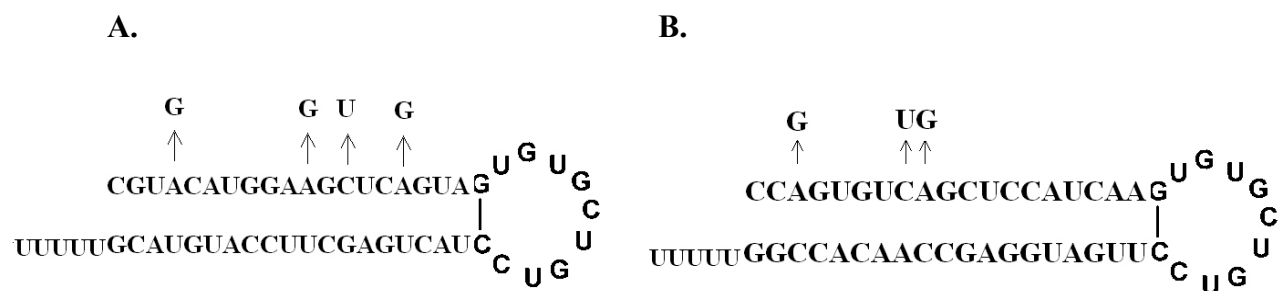
2.2.9 Urogenitaalsüsteemi dissekteerimine

RNAi mõju uurimiseks hilisemas neeru arengus eraldati loodetest urogenitaalsüsteem. Urogenitaalsüsteemi paremaks visualiseerimiseks olid looded eelnevalt kas LacZ värvinud või *in situ* hübridisatsiooni meetodil töödeldud. Pildistamiseks kasutasin mikroskoopi Olympus SZX12 ja CCD kaamerat SensiCam. Piltide redigeerimiseks kasutasin arvutiprogrammi Adobe Photoshop 7.0.

3. TULEMUSED

3.1 DNA vektoril põhineva Gata3 ja Pax8 shRNA-de disainimine

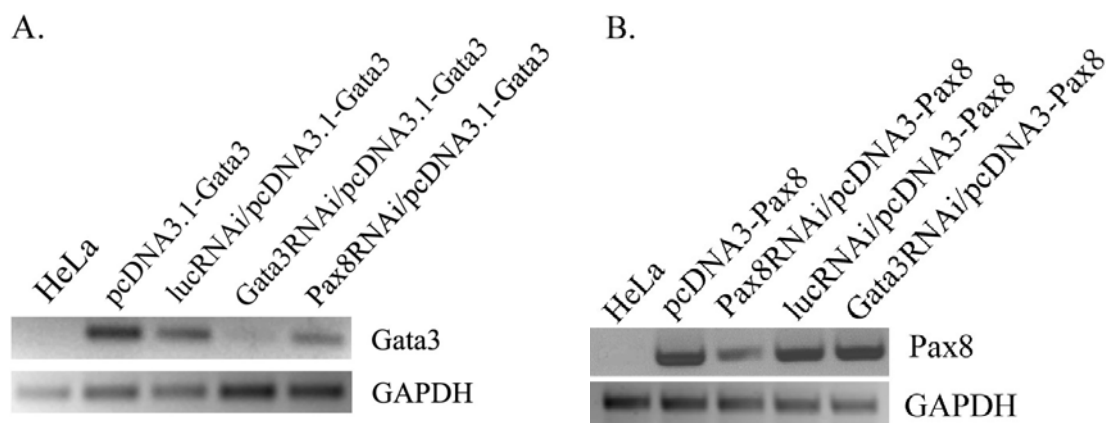
siRNA on väike 19-27 aluspaariline RNA dupleks sümmeetriliste 2 nukleotiidiliste üleulatuvate 3' otstega (Hammond *et al.*, 2001; Montgomery *et al.*, 1998; Nykanen *et al.*, 2001). RNA interferentsiks sobivaimate järjestuste leidmiseks kasutati programmi siSearch, mille algoritm valib 92% juhtudest sellise järjestuse, mis tagab vastava märklaudgeeni vähemalt 50% supressiooni. Pooled nendest 92%-st annavad aga 90% supressiooni. Samuti arvestab programm ka teiste gruppide poolt välja töötatud RNAi-de otsimise kriteeriumeid (Chalk *et al.*, 2004). Mina kasutasin oma töös 19 aluspaari pikkust *sense* järjestust, mis oli valitud hiire Gata3 ja Pax8 cDNA-de kodeerivast regioonist. *Sense* ja *antisense* järjestused olid omavahel seotud 11bp linguga, mis pärineb inimese mikroRNA-st, mi-26b (Miyagishi *et al.*, 2004). *Sense* ahelasse oli sisse viidud ka 3-4 C→T ja A→G punktmutatsiooni, et shRNA-s tekiks G:U paardumine (Miyagishi *et al.*, 2004; joonis 7). Kasutatud oligod anniilisin ja kloneerisin vektorisse RNAi-ready pSIREN-DNR-DsRed-Express, klooniid valiti ja kontrolliti sekveneerimisega.



Joonis 7. Sekundaarstruktuurid Gata3 (A) ja Pax8 (B) shRNA-dest. Nooltega on näidatud sisse viidud punktmutatsioonid. Ülemised read tähistavad *sense* järjestust ja alumised *antisense* järjestust, neid ühendab 11 nukleotiidiline ling. *Antisense* järjestusele järgneb terminatsioonisait.

3.2 Gata3RNAi ja Pax8RNAi inhibeerivad oma märklaudgeenide mRNA taset HeLa rakkudes

Geenispetsiifilise RNA interferentsi uurimiseks mRNA tasemel kasutasin RT-PCR'i meetodit. RT-PCR võimaldab semikvantitatiivselt hinnata uuritava geeni mRNA taset rakus. Oma katsetes võrdlesin Gata3 ja Pax8 mRNA hulka transientselt kotransfekteeritud HeLa rakkudes. HeLa rakke kotransfekteerisin vastavalt kas pcDNA3.1-Gata3 ekspressiooniplasmiidi ja Gata3RNAi plasmiidiga või pcDNA3-Pax8 ekspressiooniplasmiidi ja Pax8RNAi plasmiidiga. 48 tundi pärast kotransfektsiooni eraldasin totaalse RNA ja sünteesisin cDNA. Geenispetsiifilisi praimereid kasutades amplifitseerisin DNA ja võrdlesin selle hulka pcDNA3.1-Gata3 üleekspressiooniplasmiidiga transfekteeritud HeLa rakkudest pärit materjaliga. Negatiivse kontrollina kasutasin transfekteerimata HeLa rakuliinist saadud materjali. RNAi efekti spetsiifilisuse hindamiseks kotransfekteerisin HeLa rakke jaanimardika lutsiferaasi shRNA-d ekspresseeriva plasmiidi (lucRNAi) ja eraldi mõlema ekspressiooniplasmiidiga.

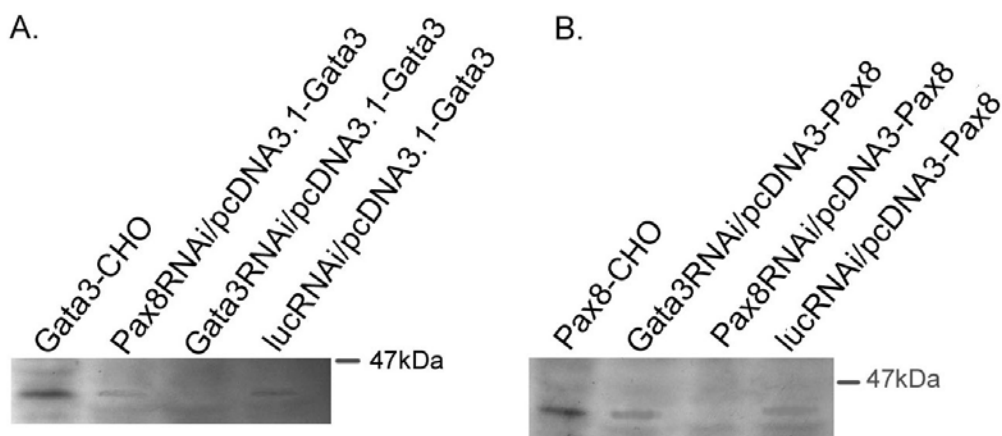


Joonis 8. Gata3 (A) ja Pax8 (B) ekspressiooni analüüs transfekteeritud HeLa rakkudes RT-PCR'i meetodiga. HeLa rakud endogeenselt Gata3 ja Pax8 ei ekspresseeri, esimene rada (A) ja (B). Ainult üleekspressiooni plasmiidiga transfekteeritud HeLa rakud ekspresseerivad kõrgel tasemel Gata3 või Pax8, teine rada (A) ja (B). Kotransfekteerimine mittespetsiifiliste RNAi konstruktidega ei mõjuta kummagi geeni ekspressiooni, kolmas ja viies rada (A) ning neljas ja viies rada (B), samas kui geenispetsiifilise RNAi kasutamine vaigistab märklaudgeenide taset kõrge efektiivsusega, neljas rada (A) ja kolmas rada (B).

RT-PCR tulemused on toodud joonisel 8. RT-PCR'i tulemused normaliseerisin GAPDH (glütseeraldehüüd-3-fosfaadi dehüdrogenaas) ekspressiooni põhjal. 48 tundi pärast kotransfektsiooni Gata3RNAi-ga oli Gata3 mRNA tase vähenenud 90% võrreldes pcDNA3.1-Gata3 transfekteeeritud rakkudes ekspresseeritud Gata3 tasemega. Pax8 mRNA tase vähenes Pax8RNAi-ga kotransfekteeeritud rakkudes 75% võrreldes ainult pcDNA3-Pax8 transfekteeeritud rakkudes ekspresseeritud Pax8 tasemega. Mõlemat katset kordasin 4 korda. Saadud tulemused näitavad veenvalt, et kasutatud Gata3 ja Pax8 shRNA-d on transientselt kotransfekteeeritud HeLa rakuliinis võimelised spetsiifiliselt alla suruma oma märklaudgeenide Gata3 ja Pax8 ekspressiooni taset.

3.3 Valgu hulk on spetsiifiliselt vähenenud RNAi-st mõjutatud rakkudes

Lisaks RT-PCR'ile, mis võimaldab hinnata geeni ekspressiooni transkriptsiooni tasemel, kasutasin RNAi efektiivsuse kontrollimiseks ka immuunoblot-i. Selle abil on võimalik hinnata, kas geeni ekspressiooni reguleerimine mRNA tasemel mõjutab ka vastava valgu hulka rakus.



Joonis 9. Gata3 ja Pax8 valgu tasemete analüüs kotransfekteeeritud HeLa rakkudes immuunoblotti meetodiga. Joonisel 9A on toodud tulemused Gata3 transfekteeeritud rakkude kohta ja 9B Pax8 transfekteeeritud rakkude kohta. Positiivse kontrollina kasutasin Gata3-CHO (9A) või Pax8-CHO (9B) püsiliini, esimesed rajad. Rakud, mida kotransfekteeeriti mittespetsiifilise shRNA-ga ekspresseerisid Gata3(A) või Pax8(B) valku, vastavalt teine ja neljas rada. Seevastu rakkudes, mida transfekteeeriti märklaudgeeni spetsiifilise shRNA-ga, ei suutnud ma valgu ekspressiooni detekteerida, kolmas rada (A) ja (B).

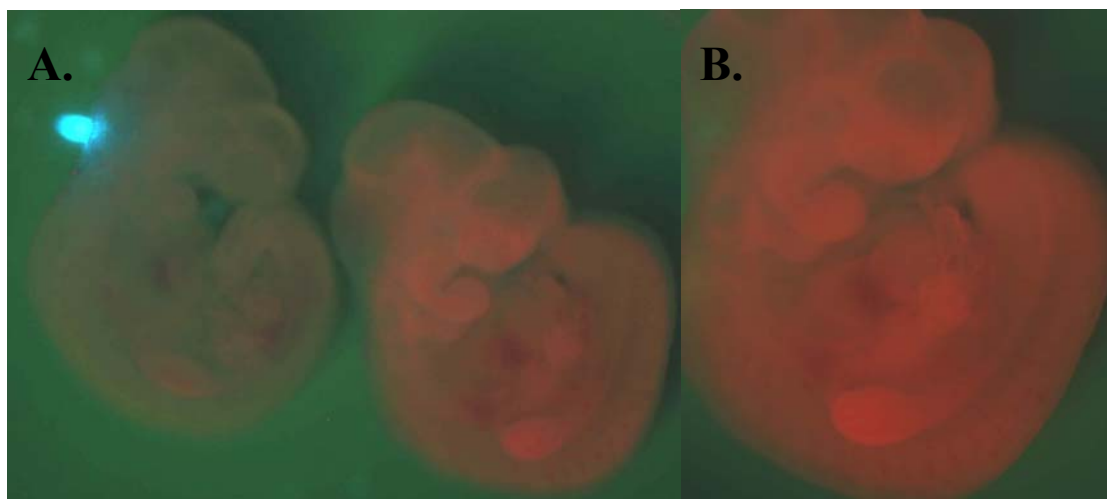
Negatiivsete kontrollidena kasutasin rakulüsaate, mis olid lüüsitud jaanimardika lutsiferaasi RNAi ja pcDNA3.1-Gata3 või pcDNA3-Pax8 kotransfekteeritud HeLa rakkudest, samuti kasutasin transfectimata HeLa rakkude lüsaati. Positiivsete kontrollidena kasutasin Gata3 ja Pax8 CHO üleekspressiooni püsiliine. 48 tundi pärast transfectiooni võis täheldada nõrka Pax8 ja Gata3 valkude taset Pax8RNAi-d ja Gata3RNAi-d ekspresseerivates rakkudes võrreldes kontrollidega. Katset viisin läbi 3 korda. Tulemused on toodud joonisel 9.

Tehtud eksperiment näitab, et Gata3 ja Pax8 shRNA-d, mida ekspresseeritakse vektori RNAi-ready pSIREN-DNR-DsRed-Express poolt, suudavad efektiivselt supresseerida Gata3 ja Pax8 valkude taset.

3.4 Gata3 reguleerib kusejuha harunemist

In vitro katsed näitasid, et konstrueeritud Gata3RNAi on võimeline vaigistama oma märklaudgeeni Gata3 ekspressiooni rakukultuuris. Transientselt transfecteeritud HeLa rakkudes reguleeriti RNAi mõjul alla nii Gata3 mRNA kui ka valgu tase. Järgnevalt otsustasin kontrollida, kas sama Gata3RNAi konstrukt suudab vaigistada ka endogeenset Gata3 ekspressiooni hiire loodetes *in vivo*. Selle meetodiga oleks võimalik uurida Gata3 funktsiooni hilises neeru arengus, mis on võimatu klassikalise *knockout* meetodiga, sest Gata3 puudumine viib loodete hukkumisele 10,5. arengupäeval (Pandolfi *et al.*, 1995). Gata3 RNAi mõju uurimiseks loodetes süstisin Gata3RNAi-d tiinete emaste sabaveeni (vt. materjal ja meetoodika). Kontrollimaks kas Gata3RNAi mõju on geenispetsiifiline, mitte üldine, kasutasin kontrolliks lucRNAi-d. Anesteseerimata emaseid hiiri süstisin kas 9.5 või 10.5 tiinuspäeval. Selleks ajaks on hiire loodetel Wolff'i juha pikenenud kloaagini ja hakkab arenema kusejuha pung (Lechner ja Dressler, 1997). Emased hukkasid 12,5. ja 13,5. tiinuspäeval, mil toimub aktiivne kusejuha harunemine ja neeru kasvamine.

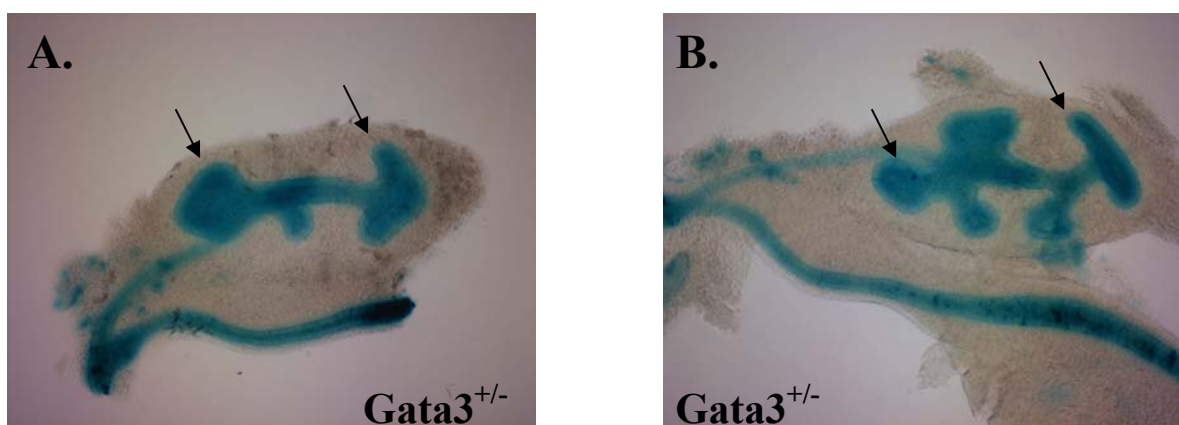
Esmalt süstisin Gata3RNAi-d metsiktüüpi tiinetesse emastesse, et jälgida, kui efektiivselt suudab RNAi vaigistada Gata3 ekspressiooni taset normaalselt arenenud loodetes. Kuna vektor RNAi-ready pSIREN-DNR-DsRed-Express, millesse oli kloneeritud Gata3 RNAi järjestused, ekspresseerib lisaks shRNA-le ka dsRed valku, siis võimaldab see hinnata loodetesse inkorporeeritud plasmidi hulka. Selleks vaadati looteid fluorestsentsvalguses (ergastus 558 nm ja emissioon 583 nm). Nagu joonisel 10 näidatud võib signaali intensiivsus varieeruda roosast tumepunaseni. Tumepunane osutab kõrgele punavalgu tasemele lootes.



Joonis 10. Punavalgu ekspressioon RNAi-ready pSIREN-DNR-DsRed-Express vektoriga süstitud loodetes. Joonisel 10A on võrdlevalt näidatud punavalgu mitteekspresseeriva (vasakul) ja ekspresseeriva (paremal) loote pilti. Viimane on kujutatud suurendatult joonisel 10B. Näha on punavalgu ekspressiooni kõikides kudedes.

Looted sorteerisin fluorestseeruva dsRed'i intensiivsuse põhjal ja fikseerisin. Gata3 mRNA ekspressiooni vaatasin *in situ* hübridisatsiooniga, kuid mingit vahet polnud märgata kontrolliga võrreldes.

Gata3 ekspressiooniga seotud loote urogenitaalsüsteemi struktuuride parema visualiseerimise eesmärgil RNAi-ga mõjutatud loodetes, kasutasin Gata3^{lacZ} hiireliine, mis sisaldavad transgeenset Gata3/lacZ alleeli. Kokku analüüsisin lacZ värvimisega (vt. materjal ja meetoodika) 60 heterosügootset Gata3^{+/-} embrüot.

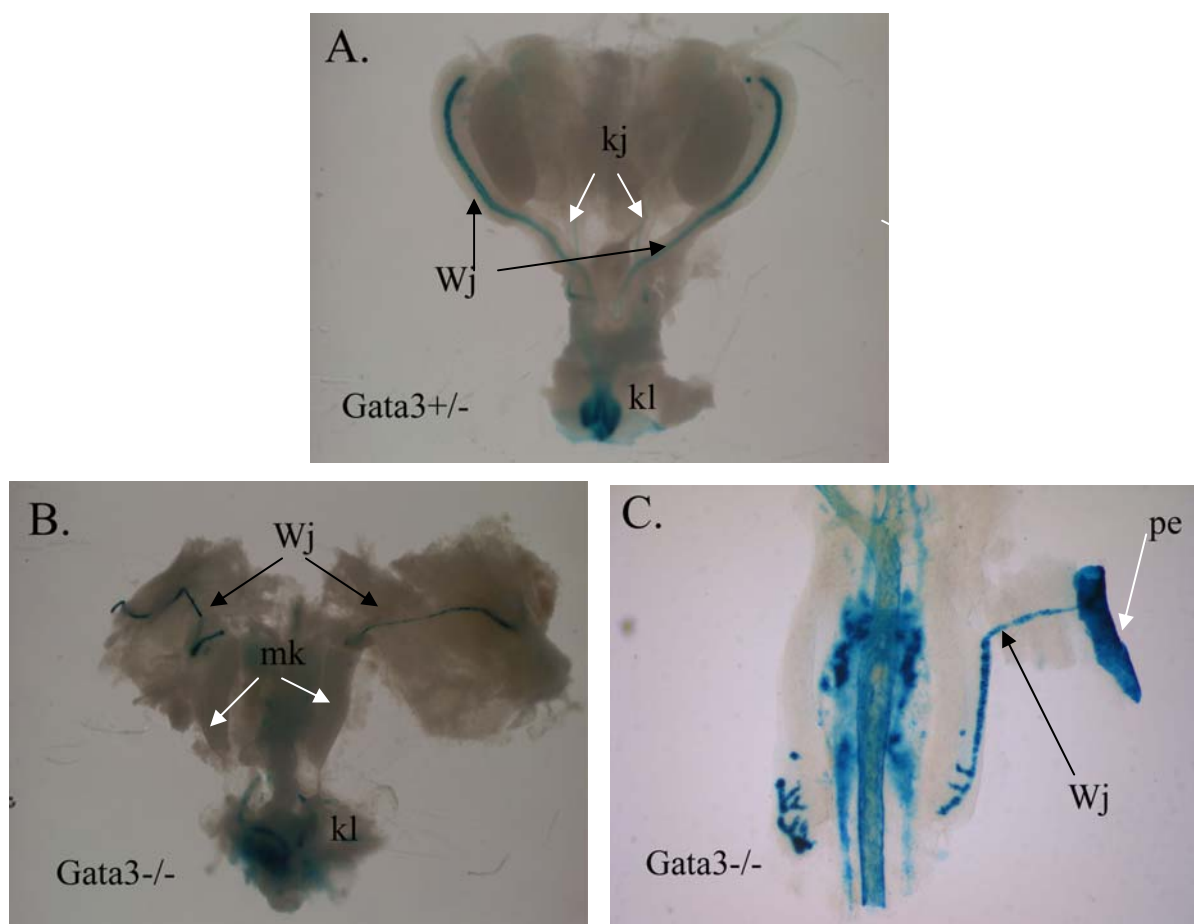


Joonis 11. Gata3 RNAi mõju kusejuha harunemisele. Looted on värvitud lacZ-ga. Joonisel 11A on näha, et loodetes (E12,5), mis ekspresseerivad Gata3 shRNAd on häiritud kusejuha harunemine võrreldes sama vanade kontroll-loodetega (11B). Harud on tähistatud nooltega.

Enamusel neist oli urogenitaalsüsteemi areng hinnanguliselt normaalne - ühtegi RNAi-st põhjustatud kõrvalekallet polnud märgata. Ainult kolmes lootes võis täheldada RNAi-st põhjustatud muutusi kusejuha arengus. Neis loodetes oli kusejuha tipp läbinud vähem harunemise tsükleid ja säilitas T-kujulise struktuuri võrreldes samavanade kontroll-loodetega, kellele polnud süstitud Gata3RNAi-d (joonis 11).

3.5 Hilised Gata3 mutantid ellujääjad

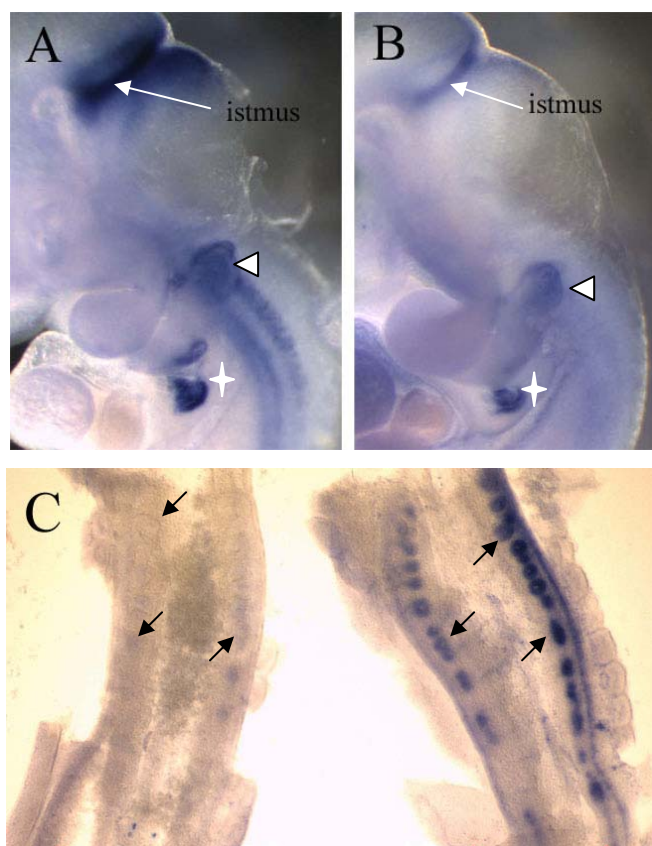
Varasemast on teada, et transkriptsioonifaktor Gata3-l on oluline roll varases neeru arengus. Homosügootsetel Gata3^{-/-} hiire embrüotel on Wolffii juha kaudaalne pikenemine häiritud - Wolffii juhad küll algselt moodustuvad, kuid ei pikene üldse või siis peatuvad poolel teel kloaaki. Seetõttu ei indutseerita loodetel metanefrose arengut. Üllatavalt õnnestus seletamata põhjustel saada nii 12,5 kui 13,5 lootepäeva vanuseid Gata3^{-/-} mutantseid homosügootseid embrüoid, keda oli süstitud Gata3RNAi-ga. Selliste loodete urogenitaalsüsteemi täpsemal uurimisel selgus, et kõigil neil hälbisid Wolffii juhad oma normaalselt trajektoorilt ja tungisid pinnaepiteeli. Indutseerimata metanefriline keelik oli selgelt tähtsustatav (joonis 12).



←Joonis 12. Hilise $Gata3^{-/-}$ ellujääja urogenitaalsüsteem võrrelduna $Gata3^{+/+}$ loote urogenitaalsüsteemiga (E13,5). Looded on värvitud lacZ-ga. Normaalsel juhul (A) on näha $Gata3$ ekspressiooni kusejuhades, Wolffii juhades ja kloaagi piirkonnas (A). Mutantsetes loodetes puuduvad kusejuhad ja $Gata3$ ekspresseeritakse Wolffii juhades ning kloaagi piirkonnas (B). Samuti on kahel pool keha on näha indutseerimata metanefrilised keelikud (B). Mutantsed Wolffii juhad on hälbinud oma trajektoorilt ja tungivad pinnaepiteeli (C). Wj – Wolffii juha, kj – kusejuha, kl – kloak, mk – metanefriline keelik, pe - pinnaepiteel.

3.6 Pax8 spetsiifiline shRNA vaigistab efektiivselt Pax8 ekspressiooni

Eelnevatele töödele ja meie labori varasematele uurimustulemustele tuginedes oletasime, et transkriptsioonifaktorid Pax2 ja Pax8 võivad sünergistlikult reguleerida $Gata3$ ekspressiooni arenevas neerus. Sellest lähtuvalt peaks mõlema Pax faktori ekspressiooni allareguleerimisel nefrogeenses piirkonnas järgnema ka $Gata3$ ekspressiooni kadu. Kuna meie käsutuses on Pax2 hiirelin, siis soovisime kasutada RNAi meetodit, et reguleerida Pax8 ekspressiooni staadiumispetsiifiliselt, mis võimaldaks jälgida $Gata3$ ekspressiooni urogenitaalsüsteemis Pax2^{-/-}, Pax8 *knockdown* hiirtes. Vastuse leidmiseks sellele küsimusele, kasutasin metsiktüüpi hiiri, keda süstisin Pax8 spetsiifilise shRNA-ga. Strateegia, mida kasutasin oli sarnane $Gata3$ hiirtel kasutatavale. Pax8RNAi-d süstisin esmalt metsiktüüpi emastesse 6,5. tiinuspäeval. Emased hukati nelja päeva pärast, 10,5. arengupäeval. Loodetesse viidud plasmidi hulka hindasin fluorestseeruva punavalgu abil. Looded sorteerisin punase värvuse intensiivsuse põhjal ja fikseerisin. Pax8 mRNA ekspressiooni Pax8RNAi-d sisaldavates loodetes vaatasin *in situ* hübridisatsiooniga (joonis 13). Erinevalt kontrolleembrüotest, kus Pax8-t ekspresseeriti kõrgel tasemel nii kesk- ja tagaaju istmuse piirkonnas, arenevas neerus ja ventraalses seljaajus, oli Pax8 mRNA vaevalt märgatav Pax8RNA-d saanud loodetes. Samas oli näha ka selget korrelatsiooni dsRed'i intensiivsuse ja mRNA taseme vahel Pax8RNAi-ga süstitud embrüotes. Kokku analüüsisime *in situ* hübridisatsiooni meetodiga 80 metsiktüüpi loodet, kellest 50%-l ekspresseeriti Pax8-t normaalsest madalamal tasemel ning neist veel pooltel Pax8 ekspressioon praktiliselt puudus.



Joonis 13. Pax8 RNAi mõju metsiktüüpi hiirte Pax8 ekspressioonile E10,5 (Pax8 in situ hübridisatsioon).

Joonisel A on näidatud RNAi-ga mõjutamata loote Pax8 ekspressioon istmuses, kõrvaalges ja kolmandas lõpusekaares. Joonisel B on kujutatud sama piirkond lootel, keda on mõjutatud Pax8 spetsiifilise RNAi-ga. Näha on Pax8 ekspressiooni vaigistust parempoolsel pildil. Joonisel C on kujutatud mesonefrilist piirkonda (mesonefrilised tuubulid on tähistatud noolekestega). Vasakpoolset loodet on mõjutatud Pax8 RNAi-ga, parempoolne on kontroll. Selgelt on näha RNAi mõju Pax8 ekspressioonile selles piirkonnas – vasakpoolses lootes praktiliselt puudub Pax8 ekspressioon, samas kui parempoolses on ta kõrgelt ekspresseeritud nii Wolffii juhas kui mesonefrilistes tuubulites. Valge noolepea osutab kõrvaalgele. Tärniga on tähistatud kolmas lõpusekaar.

4. ARUTELU

Tänu kõrgele efektiivsusele ja spetsiifikale on RNA interferents, nii taimedes, selgrootutes ning hiljuti ka imetajate rakkudes, saanud üheks laialdasemalt kasutatavaks meetodiks geenide vaigistamisel, et õppida paremini tundma nende funktsioone või kasutada neid mõnede haiguste eksperimentaalses ravis. Paljutöötavaks uueks lähenemiseks geeni ekspressiooni allasurumisel on shRNA kasutamine imetaja rakkudes, millel on mõningad eelised keemiliselt ja *in vitro* sünteesitud siRNA-de ees oma odavuse ja lihtsuse tõttu (Elbashir *et al.*, 2001; Harborth *et al.*, 2001). Tänapäevaks on disainitud palju erinevaid vektoreid, mis ekspresseerivad shRNA-d. Iseloomulikuks tunnuseks kõikidele on hiire või inimese päritolu RNA polümeraas III promootorite kasutamine. Rakkudes transkribeeritavad shRNA-d protsessitakse võtmeensüümi Dicer poolt 19-27 aluspaari pikkusteks siRNA-deks, mis viivad läbi neile komplementaarse mRNA degradatsiooni (Hammond *et al.*, 2001; Montgomery *et al.*, 1998; Nykanen *et al.*, 2001). Imetajate puhul on siRNA-de pikkus väga oluline, see peab jääma alla 30 aluspaari, et ei aktiveeritaks interferooni kaitsemehhanismi. Vastasel juhul kaasneb rakkude mittespetsiifiline translatsiooniline vaigistamine ja apoptoos (Elbashir *et al.*, 2001). Kriitilise tähtsusega siRNA-de disainimisel on õige märklaujärjestuse valimine. RNA interferentsi efektiivsus geeni ekspressiooni vaigistamisel, kasutades erinevaid siRNA-sid sama geeni erinevate piirkondade vastu, võib varieeruda olulisel määral. Kõige sobivamat ja tõhusamat siRNA selekteerimise viisi pole seni veel leitud. Siiski on praeguseks paigas juba mõningad algtööd ja loodud esimesed algoritmid, mis lihtsustavad märklaujärjestuse valikut. Antud töös kasutasime siRNA-de disainimiseks programmi siSearch, mille abil valisime 19-meersed märklaujärjestused hiire Pax8 ja Gata3 cDNA-del. Kummagi geeni jaoks valisime siSearchi poolt pakutud järjestuste hulgast kolm kõige soositumat järjestust, mille kloneerisime RNAi-ready pSIREN-DNR-DsRed-Express vektorisse. Gata3 ja Pax8 konstruktid lisasime sense ahelasse vastavalt 3 või 4 C→T ja A→G mutatsiooni, mis tekitavad G:U paardumise ja seeläbi hõlbustavad nii plasmidi replikatsiooni bakterites kui ka vähendavad mutatsioonide tekkimise tõenäosust replikatsioonil (Miyagishi *et al.*, 2004). Hilisem sekveneerimine näitas, et vaatamata nende mutatsioonide sense ahelasse sisseviimisele oli 20% juhtudest ikkagi plasmidi *E. coli*s kloneerimisel lisamutatsioonid tekkinud. Kahjuks ei oska me seda vastuolu kirjanduses avaldatu ja meie tulemuste vahel täpsemalt seletada. Oma katsetes kasutasime, vaid eelnevalt sekveneeritud, teadaoleva soovitud järjestusega shRNA plasmide.

Selleks, et vaadata, kas geenispetsiifiline RNAi omab transkriptsiooni tasemel oodatud efekti, kasutasime RT-PCR'i meetodit. Esmalt kontrollisime, kas HeLa rakkudesse kotransfekteeeritud Gata3 shRNA suudab vaigistada oma märklaudgeeni Gata3 ekspressiooni. RT-PCR'i tulemused näitasid, et rakkudes, mida oli transfekteeeritud pcDNA3.1-Gata3 plasmiidiga, ekspresseeriti kõrgel tasemel Gata3. pcDNA3.1-Gata3 kotransfekteeerimine lucRNAi-ga ei mõjutanud Gata3 taset. Samuti ei omanud Gata3 ekspressioonitasemele mingit efekti Pax8RNAi. Seevastu rakkudes, mida oli kotransfekteeeritud nii pcDNA3.1-Gata3 kui Gata3RNAi-ga, oli Gata3 ekspressioonitase väga madal. HeLa rakuliinis endogeenselt Gata3 ei ekspresseerita. Need tulemused näitasid otsustavalt, et kotransfekteeeritud Gata3RNAi vaigistab efektiivselt ja spetsiifiliselt oma märklaudgeeni ekspressiooni.

Samasugust strateegiat kasutasime ka selgitamaks Pax8 shRNA toimet rakukultuuris. pcDNA3-Pax8 plasmiidiga transfekteeeritud HeLa rakkudes ekspresseeriti Pax8 kõrgel tasemel. Rakkude mõjutamine lucRNAi ja Gata3RNAiga ei avaldanud mingit toimet Pax8 ekspressioonile. Üksnes Pax8RNAi oli võimeline spetsiifiliselt oma märklaudgeeni vaigistama. RT-PCR'i tulemusi hinnates oli tema efektiivsus mõnevõrra väiksem Gata3RNAi omast Gata3 ekspressiooni tasemele.

Lisaks RT-PCR'ile otsustasime kontrollida ka Gata3 ja Pax8 valgu taset tranfekteeeritud HeLa rakkudes immuunoblotti meetodiga. Põhjuseks on asjaolu, et efektiivseks geeni vaigistamiseks ei piisa üksnes mRNA hulga vähendamisest rakus. Efektiivse *knockdown* fenotüübi saamiseks on oluline, et ka valgu tase rakus väheneks, sest valk on see, mis kannab geeni funktsiooni rakus. Kuna Gata3 ja Pax8 on transkriptsioonifaktorid, siis võib juba nende vähene hulk rakus olla piisavaks, et tagada nende funktsioon geeni ekspressiooni reguleerimisel. Immuunoblot näitas, et tõepoolest Gata3 ja Pax8 spetsiifiline RNAi ei vii alla mitte ainult nende geenide mRNA taset rakus, vaid täielikult puudub ka valgu ekspressioon või toimub see sedavõrd madalal tasemel, et pole detekteeritav kasutatud meetodiga.

Saanud rakukultuuri katsetest kinnitust, et meie poolt konstrueeritud Gata3 ja Pax8 shRNA-d on võimelised spetsiifiliselt ja efektiivselt oma märklaudgeenide ekspressiooni HeLa rakkudes vaigistama, kasutasime järgnevalt neid plasmide, et kontrollida RNAi toimet hiire neeru arengule.

Kõigepealt kontrollisin, kas shRNA aktiivsus loodetes on võrreldav rakukultuuris saadud tulemustega. Selleks süstisin Gata3^{taulacZ} tiinete hiirte sabaveeni 20µg Gata3RNAi-d. Eeldusel, et RNAi on võimeline tugevalt Gata3 taset vaigistama, peaks selliselt olema võimalik vähemalt heterosügootsetes kui mitte metsiktüüpi embrüotes mutantset fenotüüpi esile kutsuda. Ühe organsüsteemina paljudest peaks olema häiritud ka neeru areng. Sõltuvalt tiinuspäevast, mil hiiri süstiti (E9,5 või E10,5), saab hinnata ka shRNA toimet neeru arengule. 9,5. arengupäeval süstitud heterosügootsetes embrüotes võib kõrge RNAi efektiivsuse korral eeldada isegi Wolff'i juha kaudaalse pikenemise peatumist ja kusejuha punga puudumist, mis on Gata3 homosügootsete mutantide iseloomulikuks fenotüübiks. 10,5. arengupäeval süstitud embrüote neeru areng peaks olema kaugemale jõudnud ja nende uurimine peaks heitma rohkem valgust Gata3 funktsioonile hilises neeru arengus.

Nagu tulemustes toodud leidsime, et vaid 5% loodetest (3/60), keda oli mõjutatud 9,5. arengupäeval Gata3 shRNA-ga, ilmnedid selgelt nähtavad fenotüübilised muutused 12,5 arengupäeval neeru arengus, mida võib seostada Gata3 RNAi toimega. Võrreldes samavanne kontroll-loodetega (vanus määrati tagakäpa morfoloogia põhjal), oli nimetatud 5% loodetel kusejuha 12,5. arengupäevaks vähem harunenud jäädes T-kujuliseks. Genotüübilt olid kõik need looted Gata3 heterosügootid. Ehkki saadud andmestik on väga napp, võib spekuloida, et Gata3 kontrollib mingil viisil kusejuha harunemist. Meie jaoks oli äärmiselt üllatav, et võrreldes väga efektiivse geenivaigistamisega rakukultuuris, oli Gata3 RNA interferents väga tagasihoidliku efektiivsusega *in vivo* katsetes.

Kui võtta aluseks punavalgu ekspressioon loodetes, siis on näha, et ekspressioon plasmiidilt toimub loodetes kõikides kudedes suure efektiivsusega. Üheks võimaluseks on, et transkriptsioon plasmiidilt toimub vaid lühikest aega pärast süstimist ning seega on RNAi mõju lühiajaline. Punavalgu tase püsib kõrge aga sellepärast, et tegemist on väga stabiilse valguga, mis püsib rakus pikka aega. See ei võimalda järeldada, kas tema transkriptsioon toimub ka tegelikult sel ajal, kui looted koguti. See hüpotees ei pea paika põhjusel, et ka rakukultuuris oli RNAi efekt nähtav veel 48 tundi pärast transfektsiooni. Kirjanduses on rohkelt andmeid, et kõige efektiivsemat RNAi-d põhjustavad 21-27 aluspaari pikkused siRNA molekulid. Mina aga kasutasin 19 aluspaari pikkuseid siRNA molekule. Samas pole kirjanduses mingeid andmeid selle kohta, et RNA interferents toimiks rakutasemel teisiti kui organismi tasemel. Seega pole kumbki mainitud hüpoteesist veenev seda ilmset vastuolu rakukultuuri ja *in vivo* katsete vahel seletama.

Üheks intrigeerivaks võimaluseks meie andmeid tõlgendada on oletada, et minu poolt hiire sabaveeni süstitud shRNAd kodeeriv plasmid ei suuda läbida basaalmembraani ja seega puudub ta epiteeliaalse Wolfffi juha rakkudest, struktuurist, mis spetsiifiliselt ekspresseerib varases urogenitaalsüsteemis Gata3. Nii on Davies oma kolleegidega varem näidanud, et areneva neeru mõjutamine koekultuuris Pax2 spetsiifilise RNAi-ga vaigistab efektselt üksnes metanefrilise mesenhüümi Pax2 ekspressiooni. Samas kui kusejuha pungas olev Pax2 ekspressioon püsib RNAi-st mõjutamata (Davies, 2004). Autorid pakkusid selle põhjuseks nimelt keemiliselt sünteesitud RNAi molekulide võimetuse kusejuha basaalmembraani läbida. Kuna Gata3 spetsiifiline shRNA ei vaigistanud 9,5. arengupäeval piisavalt efektiivselt Gata3 ekspressiooni Wolfffi juhas, et oleks häiritud tema morfogenees ja metanefrose induksioon, võib oletada, et Wolfffi juha pikenemine pole sedavõrd tundlik Gata3 ekspressiooni taseme suhtes, kui kusejuha punga harunemine. Selles valguses oleks äärmiselt põnev järgnevalt süstida suurem kogus Gata3 shRNA-d kodeerivat plasmidi varasemas tiinusstaadiumis (E6,5, E7,5 ja E8,5) hiirtesse, mis võimaldaks uurida ka Wolfffi juha pikenemise protsessi. Nimelt juhul, kui Wolfffi juha pikenemine toimub algselt moodustunud pronefrilise juha rakkude proliferatsiooni teel, siis hilisem Gata3 shRNA ei tohiks olulist efekti Gata3 ekspressioonile Wolfffi juhas avaldada, kuna kõrval asuva mesenhüümi rakke Wolfffi juha koosseisu ei kaasata ja seega RNA interferents Wolfffi juha rakkudes puudub. Juhul kui Wolfffi juha pikeneb läbi rakkude kaasamise vahelmisest mesodermist, siis peaks neis rakkudes leiduv Gata3 spetsiifiline shRNA vaigistama ka Gata3 ekspressiooni nendes rakkudes. Kuna praegused katsed olid tehtud suhteliselt hilises Wolfffi juha arengu etapis, siis nende põhjal selliseid järeldusi teha ei saa.

Meie poolt kogutud andmed näivad osutavat, et Gata3 ekspressioon kusejuha tipurakkudes, mis arvatavasti pole veel täielikult läbinud epiteliseerumise protsessi on vähesel määral tundlikud Gata3 shRNA suhtes. Vastusena Gata3 alla reguleerimisele selles raku-populatsioonis, häiritakse ka kusejuha harunemine. Viimane on ilmselt põhjustatud kusejuha tipurakkude ja ümbritseva mesenhüümi vahelise vastastikuse signaliseerimise defektsusest. Varem on näidatud, et neeru kogumistorude moodustumisel, mis on kusejuha päritolu, kaasatakse rakke ka metanefrilisest mesenhüümist (Qiao, 1995). Seega on üheks võimaluseks kusejuha tipu harunemise peatumist selgitada sellega, et need üksikud mesenhümaalsed rakud, mis kaasatakse kusejuha epiteeli koosseisu, sisaldavad Gata3 shRNAd ja vaigistavad

hilisema Gata3 ekspressiooni kusejuhas, mis omakorda põhjustab meie poolt nähtud arengu defekti.

Tulevikus oleks väga huvitav uurida, millist efekti neeru arengule põhjustaks Gata3 spetsiifilise shRNA-d kodeeriva plasmidi süstimine varases embrüonaalse arengu staadiumis enne neeru arengu programmi käivitumist. Samuti tuleks uurida lähemalt teiste neeru arengus osalevate geenide ekspressiooni Gata3 RNAi-ga mõjutatud embrüotes, et teada saada, kas nende ekspressioon on muutunud samamoodi kui Gata3 mutantsetes embrüotes. Uurida ka näiteks GDNF-i retseptorite ekspressiooni Gata3 RNA interferentsi mõjul defektselt harunevas kusejuha tippudes, kuna on hästi teada, et harunemine on GDNF-i signalisatsiooni poolt reguleeritud.

Pax8 shRNA toime selgitamiseks *in vivo*, süstisin metsiktüüpi emaseid hiiri 6,5. tiinuspäeval ning looted kogusin 9,5. tiinuspäeval. Nii noorte loodete Pax8 ekspressiooni vaigistamist taotlesime põhjusel, et Pax8 on varane neeru marker, mida ekspresseeritakse vahelises mesodermis juba alates 8. arengupäevast. Pax8 vaigistamine loodetes ei tohiks fenotüübilisi muutusi põhjustada, sest tema funktsioon on teadaolevalt sünergistiline Pax2 funktsiooniga. Teada on, et kumbki faktor suudab teatud määral kompenseerida teise puudumist (Bouchard *et al.*, 2000; Bouchard *et al.*, 2002). Sellegipoolest huvitas meid Pax8 shRNA aktiivsus *in vivo*, kuna Pax8 RNAi meetodit soovime järgnevalt kasutada, et uurida Pax2/8 rolli Gata3-le Pax2^{-/-}, Pax8 RNAi *knockdown* loodete neeru arengus. Sellel meetodil on mitmeid eeliseid Pax2/Pax8 topeltmutantide ees. Topeltmutantides puudub täielikult kummagi transkriptsiooni-faktori ekspressioon ja seega ei aktiveerita nende märklaudgeene. Tulemusena on häiritud neeru areng juba varases staadiumis ning see teeb võimatuks Gata3, kui ühe võtmefaktori funktsiooni uurimise. Kasutades aga meie poolt esitatud meetodit poleks neeru fenotüüp nii drastiline, sest madalal tasemel toimuks Pax8 ekspressioon. See võimaldaks uurida Pax geenide ja Gata3 vahelist interaktsiooni neeru arengus üldiselt ja loodetavasti Gata3 funktsiooni hilises neeru arengus üldiselt ja loodetavasti Gata3 funktsiooni hilises neeru arengus spetsiifiliselt. Teiseks aga on kõrge efektiivsusega Pax8 RNA interferentsi võimalik kasutada Pax2/8 topeltmutantide loomiseks soovitud arenguhetkel. Kuna hetkel on vivaariumis probleeme Pax2 hiireliiniga, ei saanud ma seda eksperimenti veel läbi viia.

Metsiktüüpi emaste hiirte süstimine Pax8 RNAi-ga 6,5. tiinuspäeval põhjustas loodetes väga tugevat geenivaigistust 9,5. arengupäevaks. *In situ* hübriidatsiooni meetod näitas, et Pax8

ekspressioon oli praktiliselt kadunud kogu arenevas urogenitaalsüsteemis. Võrreldes Pax8 RNAi efektiga rakukultuuris oli selline tulemus üllatav. Nagu oodatud oli urogenitaalsüsteemi areng üldiselt häireteta – Wolffii juha ja mesonefrilised tuubulid olid moodustunud. Kuna Pax8 ekspresseeritakse algselt mesenhümaalsetes rakkudes, siis oli tema vaigistamine RNA interferentsi poolt äärmiselt efektiivne. Asjaolu, mis lisab veelgi kaalu hüpoteesile, et Gata3 vaigistamine Wolffii juhas ei õnnestunud puhtalt seetõttu, et see struktuur on ümbritsetud basaalmembraaniga.

Üheks kitsaskohaks, mis RNAi katsetega imetajates paratamatult kaasneb on asjaolu, et tema molekulaarset mehhanismi alles õpitakse tundma. Ilmselt on mitmed olulised parameetrid ka veel defineerimata. Osa probleeme võib tulla ka viisist, kuidas shRNA organismi viiakse. Ehkki süstimine võimaldab meil täpselt kontrollida shRNA hulka ja manustamise aega, puudub kindel seisukoht tema efektiivsuse kohta. Seni on enamus RNA interferentsi puudutavatest kastetest tehtud rakukultuuri tasemel.

Töö käigus avastasime üllatavalt üksikuid 12.5. ja 13.5. arengupäeva vanuseid $Gata3^{taulacZ/taulacZ}$ ellujääjaid, keda oli süstitud Gata3RNAi-ga. Ilmselt oli nende loodete ellujäämise põhjuseks erinev geneetiline taust võrreldes $Gata3^{nls lacZ}$ hiirtega. Nende lähem uurimine näitas, et neil olid kõik tüüpilised Gata3 mutantide tunnused. Wolffii juha kaudaalsuunaline liikumine oli peatunud ning metanefrose arengut ei toimunud, ehkki kondenseerunud metanefriline keelik oli selgesti nähtav. Äärmiselt huvipakkuv oli avastus, et mutantne Wolffii juha oli tunginud läbi kehaseina ja avanenud naha pinnale. Vaatamata häälbimisele oma tavaliselt trajektoorilt olid mõlema keha poole Wolffii juhad loote kasvades pikenenud ja kindal struktuuriga, mis näitab, et Gata3 ei ole vältimatult Wolffii juha rakkude elumiseks ja Wolffii juha pikenemiseks.

5. KOKKUVÕTE

Antud magistritöös kasutasin RNA interferentsi meetodit, et uurida neeru arengut. Selle meetodiga vaigistati spetsiifiliselt transkriptsioonifaktorite Pax8 ja Gata3 ekspressiooni. Mõlemad molekulid reguleerivad mitmete organsüsteemide arengut, sealhulgas neeru arengut.

Esmalt näitasin rakukultuuris, et kasutatavad shRNA-d suudavad efektiivselt oma märklaudgeenide ekspressiooni alla reguleerida. Järgnevalt uurisin RNAi toimet *in vivo*, süstides plasmide, mis kodeerivad Pax8 või Gata3 shRNA-d tiinete hiirte sabaveeni. Selle meetodiga õnnestus meil näidata, et Gata3 osaleb neeru arengus kusejuha harunemisel. Pax8 RNAi töötas oluliselt efektiivsemalt kui Gata3 RNAi *in vivo* ja vaigistas Pax8 endogeenset ekspressiooni väga tugevalt.

Üllatava avastusena leidsime me Gata3^{taulacZ} hiireliinis üksikuid 13,5 arengupäeva vanuseid Gata3^{-/-} ellujääjaid. Nende Wolffi juhad olid hälbinud oma normaalselt trajektoorilt ja tungisid pinnaepiteeli.

6. SUMMARY

In my thesis I applied the novel RNA interference method for studying kidney morphogenesis. Using RNAi I could specifically silence the expression of transcription factors Pax8 and Gata3. Both molecules are known to regulate the development of several organ systems, including the kidneys.

At first I made experiments with cell culture to confirm that the gene specific shRNAs we had designed are efficient in silencing their targets indeed. Subsequently I studied the effect of RNAi in in vivo by injecting plasmids encoding Pax8 and Gata3 specific shRNA into the tailvein of timed pregnant mice. This method revealed that Gata3 is involved the branching morphogenesis of ureter in metanephric development. In in vivo experiments the shRNA encoding Pax8 appeared to be more efficient in suppressing the endogenous expression of Pax8, when compared to the effect that shRNA encoding Gata3 had onto its target.

Surprisingly enough, I found several E13.5 Gata3^{-/-} survivors in Gata3^{taulacZ} mouse line, while normally deficiency in Gata3 is believed to cause lethality at around E11.0. We believe this to be a genetic background effect of Gata3^{taulacZ} mice. The mutant Wolffian ducts were derailed from their normal track and intruded into the surface ectoderm instead.

TÄNUAVALDUSED

Minu kõige suuremad tänud selle magistritöö valmimisel kuuluvad minu juhendajale Madis Jakobsonile ja Rannar Airikule, kes olid alati oma heade ideede ja soovitustega minu jaoks olemas, kui neid vajasin.

Samuti suured tänud Toomas Sillale, kes õpetas mulle viroloogia õppetoolis Immunobliti tegemist ja Sulev Kuusele, kes abistas mind hiirte süstimisel.

Tänud ka minu kahele juhendajale Illar Patale ja Raivo Raidile, professor Jüri Kärnerile, toredatele laborikaaslastele ja Anne Kallingule.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Armstrong, J. F., Pritchard-Jones, K., Bickmore, W. A., Hastie, N. D., Bard, J. B. L.: The expression of the Wilms' tumor gene, *WT-1*, in the developing mammalian embryo *Mech. Dev.* 40 (1992) 85-97.
- Barasch, J.: Genes and proteins involved in mesenchymal to epithelial transition. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 10 (2001) 429-436.
- Bellairs, R., Lear, P., Yamada, K. M., Rutishauser, U., Lash, J. W.: Posterior extension of the chick nephric (Wolffian) duct: the role of fibronectin and NCAM polysialic acid. *Dev Dyn.* 202 (1995) 333-342.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., Hannon, G. J.: Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409 (2001) 363–367.
- Bouchard, M., Pfeffer, P., Busslinger, M.: Functional equivalence of the transcription factors Pax2 and Pax5 in mouse development. *Development* 127 (2000) 3703-3713.
- Bouchard, M., Souabni, A., Mandler, M., Neubuser, A., Busslinger, M.: Nephric lineage specification by Pax2 and Pax8. *Genes Dev.* 16 (2002) 2958-2970.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., Agami, R.: A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science.* 296 (2002) 550-553.
- Cacalano, G. *et al.*: GFRalpha1 is an essential receptor component for GDNF in the developing nervous system and kidney. *Neuron.* 21 (1998) 53-62.
- Caplen, N. J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A., Morgan, R. A.: Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98 (2001) 9742-9747.
- Chalk, A. M., Wahlestedt, C., Sonnhammer, E. L. L.: Improved and automated prediction of effective siRNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 319 (2004) 264-274.
- Coles, H. S., Burne, J. F., Raff, M. C.: Large-scale normal cell death in the developing rat kidney and its reduction by epidermal growth factor. *Development.* 118 (1993) 777-784.
- Cornish, J. A., Etkin, L. D.: The formation of the pronephric duct in *Xenopus* involves recruitment of posterior cells by migrating pronephric duct cells. *Dev Biol.* 159 (1993) 338-345.
- Couzin, J.: Breakthrough of the year. Small RNAs make big splash. *Science.* 298 (2002) 2296-2297.

- Cunliffe, H. E., McNoe, L. A., Ward, T. A., Devriendt, K., Brunner, H. G., Eccles, M. R.: The prevalence of PAX2 mutations in patients with isolated colobomas or colobomas associated with urogenital anomalies. *J Med Genet.* 35 (1998) 806-812.
- Davies, J. A., Lodomery, M., Hohenstein, P., Michael, L., Shafe, A., Spraggon, L., Hastie, N.: Development of an siRNA-based method for repressing specific genes in renal organ culture and its use to show that the Wt1 tumour suppressor is required for nephron differentiation. *Hum Mol Genet.* 13 (2004) 235-246.
- Davies, J. A., Bard, J. B.: The development of the kidney. *Curr Top Dev Biol.* 39 (1998) 245-301.
- Donovan, M. J., Natoli, T. A., Sainio, K., Amstutz, A., Jaenisch, R., Sariola, H., Kreidberg, J. A.: Initial differentiation of the metanephric mesenchyme is independent of WT1 and the ureteric bud. *Dev. Genet.* 24 (1999) 252-262.
- Drawbridge, J., Meighan, C. M., Mitchell, E. A.: GDNF and GFRalpha-1 are components of the axolotl pronephric duct guidance system. *Dev Biol.* 228 (2000) 116-124.
- Drawbridge, J., Steinberg, M. S.: Morphogenesis of the axolotl pronephric duct: a model system for the study of cell migration in vivo. *Int J Dev Biol.* 40 (1996) 709-713.
- Dressler, G. R., Deutsch, U., Chowdhury, K., Nornes, H. O., Gruss, P.: Pax2, a new murine paired-box-containing gene and its expression in the developing excretory system. *Development.* 109 (1990) 787-795.
- Dressler, G. R., Douglass, E. C.: Pax-2 is a DNA-binding protein expressed in embryonic kidney and Wilms tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89 (1992) 1179-1183.
- Dressler, G. R., Wilkinson J.E., Rothenpieler U.W., Patterson L.T., Williams-Simons L., Westphal H.: Deregulation of Pax-2 expression in transgenic mice generates severe kidney abnormalities. *Nature* 67(1993) 362-365.
- Drummond, I. A. *et al.*: Early development of the zebrafish pronephros and analysis of mutations affecting pronephric function. *Development.* 125 (1998) 4655-4667.
- Dudley, A. T., Godin, R. E., Robertson, E. J.: Interaction between FGF and BMP signaling pathways regulates development of metanephric mesenchyme. *Genes Dev.* 13 (1999) 1601-1613.
- Durbec, P. *et al.*: GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature* 381 (1996) 789-793.
- Eccles, M. R., Wallis, L. J., Fidler, A. E., Spurr, N. K., Goodfellow, P. J., Reeve, A. E.: Expression of the PAX2 gene in human fetal kidney and Wilms' tumor. *Cell Growth Differ.* 3 (1992) 279-289.

- Eketjäll, S., Fainzilber M., Murray-Rust J., Ibanez C.F.: Distinct structural elements in GDNF mediate binding to GFR α 1 and activation of the GFR α 1-c-Ret receptor complex. *The EMBO Journal* 18 (1999) 5901-5910.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., Tuschl, T.: RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15 (2001a) 188–200.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T.: Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411 (2001) 494–498.
- Enomoto, H. *et al.*: GFR α 1-deficient mice have deficits in the enteric nervous system and kidneys. *Neuron* 21 (1998) 317-324.
- Van Esch, H. *et al.*: GATA3 haplo-insufficiency causes human HDR syndrome. GATA3 haplo-insufficiency causes human HDR syndrome. *Nature* 406 (2000) 419-422.
- Favor, J. *et al.*: The mouse Pax2(1Neu) mutation is identical to a human PAX2 mutation in a family with renal-coloboma syndrome and results in developmental defects of the brain, ear, eye, and kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93 (1996) 13870-13875.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., Mello, C.C.: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391 (1998) 806-811.
- George, K.M., Leonard, M.W., Roth, M. E., Lieuw, K.H., Kioussis, D., Grosveld, F., Engel, J. D.: Embryonic expression and cloning of the murine GATA-3 gene. *Development* 120 (1994) 2673-2686.
- Gilbert, S.F., *Developmental Biology* (1997) Fifth Edition. Sinauer. Sunderland, MA.
- Gu, H., Marth, J. D., Orban, P. C., Mossmann, H., Rajewsky, K.: Deletion of a DNA polymerase β gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265 (1994) 103–106.
- Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R., Hannon, G. J.: Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293 (2001) 1146–1150.

- Harborth, J., Elbashir, S.M., Bechert, K., Tuschl, T., Weber, K.: Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J. Cell Sci.* 114 (2001) 4557–4565.
- Heller, N., Brandli, A. W.: *Xenopus* Pax-2/5/8 orthologues: novel insights into Pax gene evolution and identification of Pax-8 as the earliest marker for otic and pronephric cell lineages. *Dev Genet.* 24 (1999) 208-219.
- Hellmich, H. L., Kos, L., Cho, E. S., Mahon, K. A., Zimmer, A.: Embryonic expression of glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) suggests multiple developmental roles in neural differentiation and epithelial-mesenchymal interactions. *Mech Dev.* 54 (1996) 95-105.
- Hendriks, R. W., Nawijn, M. C., Engel, J. D., van Doorninck, H., Grosveld, F., Karis, A.: Expression of the transcription factor GATA-3 is required for the development of the earliest T cell progenitors and correlates with stages of cellular proliferation in the thymus. *Eur J Immunol* 29 (1999) 1912-1918
- Jacob, M., Christ, B., Jacob, H. J., Poelmann, R. E.: The role of fibronectin and laminin in development and migration of the avian Wolffian duct with reference to somitogenesis. *Anat Embryol (Berl).* 183 (1991) 385-395.
- Jacob, M., Konrad, K., Jacob, H. J.: Early development of the mullerian duct in avian embryos with reference to the human. An ultrastructural and immunohistochemical study. *Cells Tissues Organs.* 164 (1999) 63-81.
- Jing, S. *et al.*: GDNF- induced activation of the Ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR- α , a novel receptor for GDNF. *Cell* 85 (1996) 1113-1124.
- Karis, A., Pata, I., van Doorninck, J. H., Grosveld, F., de Zeeuw, C. I., de Caprona, D., Fritsch, B.: Transcription factor GATA-3 alters pathway selection of olivocochlear neurons and affects morphogenesis of the ear. *J Comp Neurol* 429 (2001) 615-630.
- Keller, S. A., Jones, J. M., Boyle, A., Barrow, L. L., Killen, P. D., Green, D. G., Kapousta, N. V., Hitchcock, P. F., Swank, R. T., Meisler, M. H.: Kidney and retinal defects (Krd), a transgene-induced mutation with a deletion of mouse chromosome 19 that includes the Pax2 locus. *Genomics.* 23 (1994) 309-320.
- Kispert, A., Vainio, S., Shen, L., Rowitch, D. H., McMahon, A. P.: Proteoglycans are required for maintenance of Wnt-11 expression in the ureter tips. *Development.* 122 (1996) 3627-3637.

- Kispert, A., Vainio, S., McMahon, A. P.: Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. *Development*. 125 (1998) 4225-4234.
- Ko, L. J. and Engel, J. D. DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol Cell Bio* 13 (1993) 4011-4022.
- Koseki, C., Herzlinger, D., al-Awqati, Q.: Apoptosis in metanephric development. *J Cell Biol*. 119 (1992) 1327-1333.
- Koutsourakis, M., Langeveld, A., Patient, R., Beddington, R., Grosveld, F.: The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. *Dev* 126 (1999) 723-732.
- Kriedberg, J. A. *et al.*: WT-1 is required for early kidney development *Cell* 74 (1993) 679-691.
- Kuhn, R., Schwenk, F., Aguet, M., Rajewsky, K.: Inducible gene targeting in mice. *Science* 269 (1995) 1427-1429.
- Kuure, S., Vuolteenaho, R., Vainio, S.: Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation. *Mech Dev*. 92 (2000) 31-45.
- Labastie, M. C., Catala, M., Gregoire, J. M., Peault, P.: The GATA-3 gene is expressed during human kidney embryogenesis. *Kidney Int* 47 (1995) 1597- 1603.
- Lakshmanan, G., Lieu, K. M., Lim, K. C., Gu, Y., Grosveld, F., Engel, J. D., Karin, A.: Localization of distant urogenital system-, central nervous system-, and endocardium-specific transcriptional regulatory elements in the GATA-3 locus. *Mol Cell Biol* 19 (1999) 1558-1568.
- Lechner M. S., Dressler G. R.: The molecular basis of embryonic kidney development. *Mech Dev*. 62 (1997) 105-120.
- Lim, K. C., Lakshmanan, G., Crawford, S. E., Gu, Y., Grosveld, F., Engel, J. D.: Gata3 loss leads to embryonic lethality due to noradrenaline deficiency of the sympathetic nervous system. *Nat Genet*. 25 (2000) 209-212.
- Lin L-FX., Doherty D.H., Lile J.D., Bektesh S., Collins F.: GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260 (1993) 1130-1132.

- Lin, Y. *et al.*: Induction of ureter branching as a response to Wnt-2b signaling during early kidney organogenesis. *Dev Dyn.* 222 (2001) 26-39.
- Lipschutz, J. H.: Molecular development of the kidney: a review of the results of gene disruption studies. *Am J Kidney Dis.* 31 (1998) 383-397.
- Luo, G., Hofmann, C., Bronckers, A. L., Sohocki, M., Bradley, A., Karsenty, G.: BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev.* 9 (1995) 2808-2820.
- Lynch, K., Fraser, S. E.: Cell migration in the formation of the pronephric duct in *Xenopus laevis*. *Dev Biol.* 142 (1990) 283-292.
- Lyons, K. M., Hoganand B. L. M., Robertson E. J.: Colocalization of BMP 7 and BMP 2 RNAs suggests that these factors cooperatively mediate tissue interactions during murine development. *Mech Dev.* 50 (1995) 71-83.
- Magre, S., Jost, A.: Dissociation between testicular organogenesis and endocrine cytodifferentiation of Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81 (1984) 7831-7834.
- Maine, E. M.: A conserved mechanism for post-transcriptional gene silencing. *Genome Biol* 1 (2000) 1018–1022.
- Majumdar, A., Vainio, S., Kispert, A., McMahon, J., McMahon, A. P.: Wnt11 and Ret/Gdnf pathways cooperate in regulating ureteric branching during metanephric kidney development. *Development.* 130 (2003) 3175-3185.
- Mansouri, A., Hallonet, M., Gruss, P.: Pax genes and their roles in cell differentiation and development. *Curr Opin Cell Biol.* 8 (1996) 851-857.
- Mansouri, A., Chowdhury, K., Gruss, P.: Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nat Genet.* 19 (1998) 87-90.
- McManus, M. T., Sharp, P. A.: Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet.* 3 (2002) 737-747.
- Medvinsky, A., Dzierzak, E.: Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell.* 86 (1996) 897-906.
- Merika, M., Orkin, S. H.: DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol Cell Biol* 13 (1993) 3999-4010.
- Merlet-Benichou, C., Vilar, J., Lelievre-Pegorier, M., Moreau, E., Gilbert, T.: Fetal nephron mass: its control and deficit. *Adv Nephrol Necker Hosp.* 26 (1997) 19-45.

- Miyagishi, M., Sumimoto, H., Miyoshi, H., Kawakami, Y., Taira, K.: Optimization of an siRNA-expression system with an improved hairpin and its significant suppressive effects in mammalian cells. *J Gene Med.* 6 (2004) 715-23.
- Mocellin, S., Provenzano, M.: RNA interference: learning gene knock-down from cell physiology. *J Transl Med.* 2 (2004) 39-45.
- Molkentin, J. D., Lin, Q., Duncan, S. A., Olson, E. N.: (1997) Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev* 11 (1997) 1061-1072.
- Montgomery, M.K., Xu, S., Fire, A.: RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 15502–15507.
- Moore, M.W. *et al.*: Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature* 382 (1996) 76-79.
- Nornes, H. O., Dressler, G. R., Knapik, E. W., Deutsch, U., Gruss, P.: Spatially and temporally restricted expression of Pax2 during murine neurogenesis. *Development.* 109 (1990) 797-809.
- Nunez, G., Clarke, M. F.: The Bcl-2 family of proteins: regulators of cell death and survival. *Trends Cell Biol.* 4 (1994) 399-403.
- Nykanen, A., Haley, B., Zamore, P. D.: ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107 (2001) 309–321.
- Obara-Ishihara, T., Kuhlman, J., Niswander, L., Herzlinger, D.: The surface ectoderm is essential for nephric duct formation in intermediate mesoderm. *Development.* 126 (1999) 1103-1108.
- Otteson, D. C., Shelden, E., Jones, J. M., Kameoka, J., Hitchcock, P. F.: Pax2 expression and retinal morphogenesis in the normal and Krd mouse. *Dev Biol.* 193 (1998) 209-224.
- Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J., Conklin, D. S.: Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* 16 (2002) 948-958.
- Paddison, P. J., Hannon, G. J.: RNA interference: the new somatic cell genetics? *Cancer Cell.* 2 (2002) 17-23.

- Pandolfi, P. P., Roth, M. E., Karis, A., Leonard, M. W., Dzierzak, E., Grosveld, F. G., Engel, J. D., Lindenbaum, M. H.: Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nat Genet* 11 (1995) 40-44.
- Pata, I., Studer, M., van Doorninck, J. H., Briscoe, J., Kuuse, S., Engel, J. D., Grosveld, F., Karis, A.: The transcription factor GATA3 is a downstream effector of Hoxb1 specification in rhombomere 4. *Development* 126 (1999) 5523-5531.
- Pelletier, J., Schalling, M., Buckler, A. J., Rogers, A., Haber, D. A., Housman, D.: Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system. *Genes Dev.* 5 (1991) 1345-1356.
- Pepicelli, C. V., Kispert, A., Rowitch, D. H., McMahon, A. P.: GDNF induces branching and increased cell proliferation in the ureter of the mouse. *Dev Biol.* 192 (1997) 193-198.
- Pfeffer, P. L., Gerster, T., Lun, K., Brand, M., Busslinger, M.: Characterization of three novel members of the zebrafish Pax2/5/8 family: dependency of Pax5 and Pax8 expression on the Pax2.1 (noi) function. *Development.* 125 (1998) 3063-3074.
- Pichel, J.G. *et al.*: Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* 382 (1996) 73-76.
- Plachov, D., Chowdhury, K., Walther, C., Simon, D., Guenet, J. L., Gruss, P.: Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland. *Development.* 110 (1990) 643-651.
- Poleev, A., Fickenscher, H., Mundlos, S., Winterpacht, A., Zabel, B., Fidler, A., Gruss, P., Plachov, D.: PAX8, a human paired box gene: isolation and expression in developing thyroid, kidney and Wilms' tumors. *Development.* 116 (1992) 611-623.
- Pritchard-Jones, K. *et al.*: The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature.* 346 (1990) 194-197.
- Qiao, J., Cohen, D., Herzlinger, D.: The metanephric blastema differentiates into collecting system and nephron epithelia in vitro. *Development.* 121 (1995) 3207-3214.
- Rothenpieler, U.W., Dressler, G.R.: Pax-2 is required for mesenchyme-to-epithelium conversion during kidney development *Development* 119 (1993) 711-720.
- Rupprecht, H. D., Drummond, I. A., Madden, S. L., Rauscher, F. J. 3rd, Sukhatme, V. P.: The Wilms' tumor suppressor gene WT1 is negatively autoregulated. *J Biol Chem.* 269 (1994) 6198-6206.

- Ryan, G., Steele-Perkins, V., Morris, J. F., Rauscher, F. J. 3rd, Dressler, G. R.: Repression of Pax-2 by WT1 during normal kidney development. *Development*. 121 (1995) 867-875.
- Saarma, M.: GDNF-a stranger in the TGF- β superfamily? *Eur. J. Biochem*. 267 (2000) 6968-6971.
- Sainio, K. *et al.*: Glial-cell-line-derived neurotrophic factor is required for bud initiation from ureteric epithelium. *Development*. 124 (1997) 4077-4087.
- Sainio, K., Raatikainen-Ahokas, A.: Mesonephric kidney--a stem cell factory? *Int J Dev Biol*. 43 (1999) 435-439.
- Sanchez, M.P., Silos-Santiago, I., Frisen, J., He, B., Lira, S.A., Barbacid, M.: Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature* 382 (1996) 70-73.
- Sanyanusin, P., Schimmenti, L. A., McNoe, L. A., Ward, T. A., Pierpont, M. E., Sullivan, M. J., Dobyns, W. B., Eccles, M. R.: Mutation of the PAX2 gene in a family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux. *Nat Genet*. 9 (1995) 358-364.
- Sariola, H., Saarma, M.: GDNF and its receptors in the regulation of the ureteric branching. *Int.J.Dev.Biol*. 43 (1999) 413-418.
- Saxen, L.: Organogenesis of the kidney. *Cambridge: Cambridge University Press*. (1987).
- Scharnhorst, V., van der Eb, A. J., Jochemsen, A. G.: WT1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene*. 273 (2001) 141-161.
- Schuchardt, A., D'Agati, V., Larsson-Blomberg, L., Costantini, F., Pachnis, V.: Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature*. 367 (1994) 380-383.
- Schuchardt, A., D'Agati, V., Pachnis, V., Costantini, F.: Renal agenesis and hypodysplasia in ret-k- mutant mice result from defects in ureteric bud development. *Development*. 122 (1996) 1919-1929.
- Serluca, F. C., Fishman, M. C.: Pre-pattern in the pronephric kidney field of zebrafish. *Development*. 128 (2001) 2233-2241.
- Shen, C., Buck, A. K., Liu, X., Winkler, M., Reske, S. N.: Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. *FEBS Lett* 539 (2003) 111–115.
- Silva, J., Chang, K., Hannon, G. J., Rivas, F. V.: RNA-interference-based functional genomics in mammalian cells: reverse genetics coming of age. *Oncogene*. 23 (2004) 8401-8409.
- Simon, M. C.. Gotta have GATA. *Nat Genet*. 11 (1995) 9-11.

- Smith, C., McKay, S.: Morphological development and fate of the mouse mesonephros. *J. Anat.* 174 (1991) 171-184.
- Srinivas, S., Wu, Z., Chen, C. M., D'Agati, V., Costantini, F.: Dominant effects of RET receptor misexpression and ligand-independent RET signaling on ureteric bud development. *Development.* 126 (1999) 1375-1386.
- Stark, K., Vainio, S., Vassileva, G., McMahon, A.P.: Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4 *Nature* 372 (1994) 679-683.
- Stewart, S. A., Dykxhoorn, D. M., Palliser, D., Mizuno, H., Yu, E. Y., An, D. S., Sabatini, D. M., Chen, I. S., Hahn, W. C., Sharp, P. A., Weinberg, R. A., Novina, C. D.: Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA* 9 (2003) 493-498.
- St-Onge L., Pituello F., Gruss P.: The role of *Pax* genes during murine development. *Semin. Dev. Biol.* 6 (1995) 285-292.
- Strachan, T., Read, A. P.: PAX genes. *Curr Opin Genet Dev.* 4 (1994) 427-438.
- Zamore, P. D.: RNA interference: listening to the sound of silence. *Nat Struct Biol* 8 (2001) 746-750.
- Zannini, M., Francis-Lang, H., Plachov, D., Di Lauro, R.: Pax-8, a paired domain-containing protein, binds to a sequence overlapping the recognition site of a homeodomain and activates transcription from two thyroid-specific promoters. *Mol Cell Biol.* 12 (1992) 4230-4241.
- Tagge, E. P., Hanson, P., Re, G. G., Othersen, H. B. Jr., Smith, C. D., Garvin, A. J.: Paired box gene expression in Wilms' tumor. *J Pediatr Surg.* 29 (1994) 134-141.
- Torres, M., Gomez-Pardo, E., Dressler, G. R., Gruss, P.: Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development.* 121 (1995) 4057-4065.
- Treanor, J. J. S. *et al.*: Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature* 382 (1996) 80-83.
- Trupp, M. *et al.*: Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene. *Nature* 381 (1996) 785-789.
- Vainio, S., Heikkila, M., Kispert, A., Chin, N., McMahon, A. P.: Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature.* 397 (1999) 405-409.
- Vainio, S., Muller, U.: Inductive tissue interactions, cell signaling, and the control of kidney organogenesis. *Cell.* 90 (1997) 975-978.
- Valerius, M. T., Patterson, L. T., Witte, D. P., Potter, S. S.: Microarray analysis of novel cell lines representing two stages of metanephric mesenchyme differentiation. *Mech Dev.* 112 (2002) 219-232.

- Vega, Q. C., Worby, C. A., Lechner, M. S., Dixon, J. E., Dressler, G. R.: Glial cell line-derived neurotrophic factor activates the receptor tyrosine kinase RET and promotes kidney morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93 (1996) 10657-10661.
- Wintour, E. M., Butkus, A., Earnest, L., Pompolo, S.: The erythropoietin gene is expressed strongly in the mammalian mesonephric kidney *Blood* 88 (1996) 3349-3353.
- Vize, P. D., Seufert, D. W., Carroll, T. J., Wallingford, J. B.: Model systems for the study of kidney development: use of the pronephros in the analysis of organ induction and patterning. *Dev Biol*. 188 (1997) 189-204.
- Whyatt, D. J., de Boer, E., Grosveld, F.: The two zinc finger-like domains of GATA-1 have different DNA binding specificities. *EMBO J*. 12 (1993) 4993-5005.
- Wodarz, A., Nusse, R.: Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 14 (1998) 59-88.
- Yamamoto, M., Ko, L. J., Leonard, M. W., Beug, H., Orkin, S. H., Engel, J. D.: Activity and tissue-specific expression of the transcription factor NF-E1 multigene family. *Genes Dev* 4 (1990) 1650-1662.
- Yang, D., Buchholz, F., Huang, Z., Goga, A., Chen, C. Y., Brodsky, F. M., Bishop, J. M.: Short RNA duplexes produced by hydrolysis with *Escherichia coli* RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (2002) 9942-9949.